

Untersuchungen der Expression, Funktion und Struktur archaeeeller Membrantransportproteine



Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der Fakultät für Biologie und Vorklinische Medizin der

Universität Regensburg

vorgelegt von

Stefanie Daxer

aus Freilassing

im Jahr 2016

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am: 08.01.2016

Die Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. Christine Ziegler

Unterschrift:

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Transportproteinklassen	1
1.2 Herausforderungen bei der Arbeit mit Transportproteinen	3
1.3 Archaeelle Membrantransportsysteme: Sequenz und Funktion	7
1.4 Transporter der Major Facilitator Superfamilie	10
1.5 <i>Ignicoccus hospitalis</i> : Modellsystem für Funktionelle Kompartimentierung	12
1.6 <i>Ignicoccus hospitalis</i> und <i>Nanoarchaeum equitans</i> : eine „intimate association“	15
1.7 Energietransport in <i>Ignicoccus hospitalis</i>	17
1.7.1 Klassische ATP-Transporter	17
1.7.2 Putativer ATP Transporter in <i>Ignicoccus hospitalis</i> ?	19
1.8 Ziele dieser Arbeit	19
2 Material und Methoden	21
2.1 Verwendete Substanzen und Materialien	21
2.1.1 Chemikalien	21
2.1.2 Detergenzien	22
2.1.3 Enzyme	23
2.1.4 Molekulare Massenstandards	23
2.1.5 Reaktionskits und Screens	23
2.1.6 Antikörper	23
2.1.6.1 Primäre Antikörper	23
2.1.6.2 Sekundäre Antikörper	24
2.1.7 Säulen und Säulenmaterial	24
2.1.8 Sonstige Materialien	24
2.1.9 Geräte	24

Inhaltsverzeichnis

2.2 Sterilisation.....	26
2.3 Medien und Antibiotika.....	26
2.3.1 Medien für die <i>E. coli</i> Expression	26
2.3.1.1 SOC-Medium (Hanahan, 1983).....	26
2.3.1.2 LB-Medium (Bertani, 1951)	26
2.3.1.3 2YT Medium	27
2.3.2 Medien für die <i>P. furiosus</i> Expression	27
2.3.3 Medien für die <i>P. pastoris</i> Expression	27
2.3.4 Medien für die Zellkultur (Sf9-Zellen)	28
2.3.5 Antibiotika	28
2.4 Verwendete Organismen	28
2.4.1 Bakterielle Zellstämme	28
2.4.1.1 Klonierungszellstämme	29
2.4.1.2 Expressionszellstämme	29
2.4.2 Archaeelle Organismen	30
2.4.3 Eukaryotische Zellstämme.....	30
2.5 Mikroskopie.....	30
2.5.1 Lichtmikroskopie	30
2.5.2 Transmissionselektronenmikroskopie.....	30
2.6 Plasmide	31
2.7 Oligonukleotide	32
2.8 Molekularbiologische Methoden	33
2.8.1 Polymerase Kettenreaktion (PCR)	33
2.8.2 Fusions-PCR	33
2.8.3 Agarose-Gelelektrophorese	34
2.8.4 Restriktionsenzymverdau	35
2.8.5 Ligation	35
2.8.6 Herstellung chemisch kompetenter Zellen	35

2.8.6.1 Transformationspuffer	36
2.8.6.2 Durchführung	36
2.8.7 Transformation von <i>E. coli</i>	36
2.8.8 Kolonie-PCR	37
2.8.9 Isolierung von Plasmid-DNA und Sequenzierung.....	37
2.8.10 Bestimmung der DNA-Konzentration.....	37
2.9 Proteinbiochemische Methoden.....	38
2.9.1 Proteinkonzentrationsbestimmung	38
2.9.1.1 Konzentrationsbestimmung mittels BCA	38
2.9.1.2 Bradford-Test	38
2.9.1.3 Konzentrierung von Proteinlösungen	38
2.9.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	38
2.9.3 Native-PAGE	40
2.9.3.1 Clear Native Elektrophorese (CNE).....	40
2.9.3.2 Blue Native Elektrophorese (BNE).....	41
2.9.4 Western Blot.....	41
2.9.4.1 Proteintransfer im Wetblot-Verfahren	41
2.9.4.2 Immunologischer Nachweis durch alkalische Phosphatase.....	42
2.9.4.3 Immunologischer Nachweis durch Fluoreszenz	42
2.9.5 Massenspektroskopie: MALDI-TOF MS/MS	43
2.10 Heterologe Expressionssysteme	44
2.10.1 Prokaryotische Expressionssysteme.....	44
2.10.1.1 Expression in <i>E. coli</i>	44
2.10.1.1.1 Transformation.....	44
2.10.1.1.2 IPTG-induzierte Expression	44
2.10.1.1.3 Ernte	44
2.10.1.1.4 Green Fluorescent Protein (GFP)-basierte Optimierung der Expression	45
2.10.1.2 Expression in <i>P. furiosus</i>	45

Inhaltsverzeichnis

2.10.1.2.1 Transformation.....	46
2.10.1.2.2 Pyruvat induzierte Expression	47
2.10.1.2.3 Ernte	47
2.10.1.3 Expression in <i>T. kodakarensis</i>	47
2.10.2 Eukaryotische Expressionssysteme	47
2.10.2.1 Expression in <i>P. pastoris</i>	47
2.10.2.1.1 Transformation.....	47
2.10.2.1.2 Methanol-induzierte Expression	48
2.10.2.1.3 Ernte	49
2.10.2.2 Expression in Sf9 Insektenzellen	49
2.10.2.2.1 Baculovirus vermittelte Proteinexpression in Insektenzellen (Sf9)	49
2.10.2.2.2 Monolayerkulturen	49
2.10.2.2.3 Suspensionskulturen	50
2.10.2.2.4 Konservierung und Auftauen von Zellen.....	50
2.10.2.2.5 Herstellung rekombinanter Baculoviren	51
2.10.2.2.6 Plaque-Assay zur Bestimmung des Virustiters	52
2.10.2.2.7 Transfektion einer Suspensionskultur.....	53
2.11 Zellaufschluss und Membranpräparation	54
2.12 Solubilisierung	55
2.13 Immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC).....	55
2.13.1 Durchlauf-Verfahren	56
2.13.2 Batch-Verfahren	56
2.13.3 Dynabeads® His-Tag Isolierung	57
2.14 Gelfiltrations-Chromatographie	57
2.15 Proteinkristallisation	58
2.16 Tryptophan-Fluoreszenzmessung	59
2.17 Bioinformatische Analysen.....	59
3 Ergebnisse.....	61

3.1 Bioinformatische Analysen der Membranproteine von <i>I. hospitalis</i>	61
3.2 Heterologe Expression verschiedener Membranproteine von <i>I. hospitalis</i>	63
3.2.1 Heterologe Expression in <i>E. coli</i>	63
3.2.1.1 Klonierung	63
3.2.1.2. Expression	63
3.2.2 Heterologe Expression in <i>P. furiosus</i> und <i>T. kodakarensis</i>	66
3.2.2.1 Klonierung	66
3.2.2.2 Expression.....	67
3.3 Analyse des MFS Transporters Tko1655 von <i>T. kodakarensis</i>	67
3.3.1 Klonierung von Tko1655.....	67
3.3.2 Heterologe Expression in <i>E. coli</i> und Reinigung von Tko1655	68
3.4 Analyse des MFS Transporters Iho0391 von <i>I. hospitalis</i>	71
3.4.1 Erstellung eines Homologiemodells	71
3.4.2 Heterologe Expression in <i>E. coli</i> und Reinigung von Iho0391	74
3.4.3 Heterologe Expression in eukaryotischen Systemen	78
3.4.3.1 Klonierung von Iho0391	78
3.4.3.2 Expression von Iho0391 in Sf9.....	79
3.4.3.3 Expression von Iho0391 in <i>P. pastoris</i>	81
3.4.3.3.1 Reinigung von Iho0391.....	82
3.4.3.3.2 Funktionelle Analyse von Iho0391	86
3.4.3.3.3 Lokalisation von Iho0391.....	87
3.5 Heterologe Expression des Anionenkanals Neq014 in <i>E. coli</i>	88
3.5.1 Klonierung von Neq014.....	88
3.5.2 Expression und Reinigung von Neq014 (nicht-codonoptimiert).....	88
3.5.3 Expression, Reinigung und Analyse von Neq014 (codonoptimiert).....	91
4 Diskussion	99
4.1 Analyse von Membranproteinen aus <i>I. hospitalis</i> und <i>N. equitans</i>	99
4.1.1 Bioinformatische Analysen.....	99

Inhaltsverzeichnis

4.1.1.1 Analyse verschiedener Membranproteine von <i>I. hospitalis</i>	99
4.1.1.2 Analyse eines Membranproteins von <i>N. equitans</i>	102
4.1.2 Heterologe Expression und Reinigung	104
4.1.2.1 Heterologe Expression in <i>E. coli</i>	105
4.1.2.2 Heterologe Expression in anderen Archaeen.....	111
4.1.2.3 Heterologe Expression in eukaryotischen Systemen	112
4.2 Analyse des MFS Transporters Tko1655 von <i>T. kodakarensis</i>	114
4.3 Putative ATP-Transportfunktion des MFS Transporters Iho0391	115
4.4 Ausblick	118
5 Zusammenfassung.....	125
6 Literaturverzeichnis	127
7 Anhang.....	141
A Abkürzungsverzeichnis.....	141
B Abbildungsverzeichnis.....	145
C Tabellenverzeichnis	147
D Zugangsnummern für Membranproteine.....	147
E Sequenzalignments verschiedener Membranproteine von <i>I. hospitalis</i> und <i>N. equitans</i>	148
F Zusammensetzung der 24-well Kristallisationsscreens für Neq014.....	151
G Publikationen	151
H Danksagung.....	152
I Eidesstattliche Erklärung	155

1 Einleitung

1.1 Transportproteinklassen

Obwohl 20 bis 30 % der Gene in Prokaryoten und Eukaryoten für Membranproteine codieren, sind diese in den Proteindatenbanken deutlich unterrepräsentiert. Von den über 112000 Einträgen gelöster Proteinstrukturen in der „Protein Data Bank“ (PDB), sind weniger als 2 % Membranproteinen zuzuordnen (PDB, Stand Oktober 2015). Dabei verrichten Membranproteine einige der wichtigsten Aufgaben innerhalb einer Zelle. Sie sind an vielerlei biologischen Prozessen, wie zum Beispiel der Signaltransduktion, Zell-Zell-Interaktionen und der intrazellulären Kompartimentierung, beteiligt. Außerdem sind sie für Prozesse der Energiegewinnung und für diverse Transportmechanismen unabdinglich (Wu und Yates, 2003). Da sich alle Organismen durch biologische Membranen, welche selektive Permeabilitätsbarrieren darstellen, von ihrer Umgebung abgrenzen, ist gerade ein durch Membranproteine vermittelter, gezielter Transport von größter Wichtigkeit. Nur so kann ein hinreichender Stoff- und Informationsaustausch gewährleistet werden. Dabei werden nicht nur essentielle Substanzen wie Nährstoffe und Ionen aufgenommen, sondern auch Stoffwechselendprodukte oder Schadstoffe ausgeschieden. Auch der Transport von Stoffen und Molekülen innerhalb einer Zelle benötigt die Anwesenheit von Transportproteinen in den Membranen. Grundsätzlich können Transportvorgänge in aktiven oder passiven Transport gegliedert werden. Passiver Transport beruht auf Diffusion entlang eines Konzentrationsgradienten, aktiver Transport erfolgt entgegen eines Konzentrationsgefälles. Letzterer verbraucht deshalb Energie, die in Form von ATP, Licht (primär aktiv) oder durch einen elektrochemischen Gradienten (sekundär aktiv) bereitgestellt wird. Des Weiteren können im Wesentlichen vier Transportproteinklassen unterschieden werden: Kanäle, primäre Transporter, sekundäre Transporter und Gruppentranslokationssysteme (Abb. 1; Albers und Driessen, 2008).

Kanalproteine durchspannen die Membran tunnelartig und erlauben es, Substrate mittels erleichterter Diffusion passiv durch die Membran zu schleusen (Abb. 1 A). Kanäle können durch Liganden, Spannung, Temperatur oder auch mechanisch gesteuert werden. Sind sie jedoch einmal geöffnet, diffundieren Moleküle von einer Seite der Membran auf die andere und zwar so lange, bis die Konzentration des transportierten Stoffes auf beiden Seiten ausgeglichen ist oder bis sich der Kanal wieder schließt. Primäre Transporter nutzen Licht oder chemische Energie, um die Translokation von Substraten anzutreiben. Ein sehr gut untersuchtes Beispiel sind die ABC-Transporter. Diese bestehen meist aus

zwei integralen Membranproteinen und zwei cytoplasmatischen ATP-bindenden Proteinen (ATP-bindende Kasette bzw. *ATP binding cassette*, ABC; Abb. 1 B). Durch die Hydrolyse von ATP können Substrate aktiv durch die Membran transportiert werden. Zum Teil sind dafür spezifische Substratbindepoteine notwendig, weshalb die ABC-Transporter auch als Bindeprotein-abhängige Transportsysteme bezeichnet werden. Sekundäre Transporter nutzen die Energie bestehender elektrochemischer Gradienten, um Moleküle aktiv durch die Membran zu befördern und werden wiederum in drei Klassen eingeteilt (Abb. 1 A). Uniporter transportieren Substrate einzeln, Symporter transportieren zwei Substrate gleichzeitig in einer Richtung durch die Membran. Antiporter hingegen bewegen zwei Substanzen in entgegengesetzter Richtung. Einen Sonderfall stellen die Bindeprotein-abhängigen sekundären Transporter dar. Sie funktionieren wie Symporter, sind jedoch an ein spezifisches Substratbindepotein gekoppelt. Gruppentranslokationssysteme koppeln den aktiven Transport von Substraten (meist Monosacchariden) an eine Phosphorylierungsreaktion. Durch die chemische Veränderung des Substrates wird kein Konzentrationsgradient entlang der Membran aufgebaut und somit eine Rückdiffusion vermieden. Diese Form des Transports wurde bisher nur bei Bakterien gefunden und das sogenannte PEP-PTS (Phosphoenolbrenztraubensäure-Phosphotransferase-System) von *E. coli* ist das am besten untersuchte Gruppentranslokationssystem (Abb. 1 B).

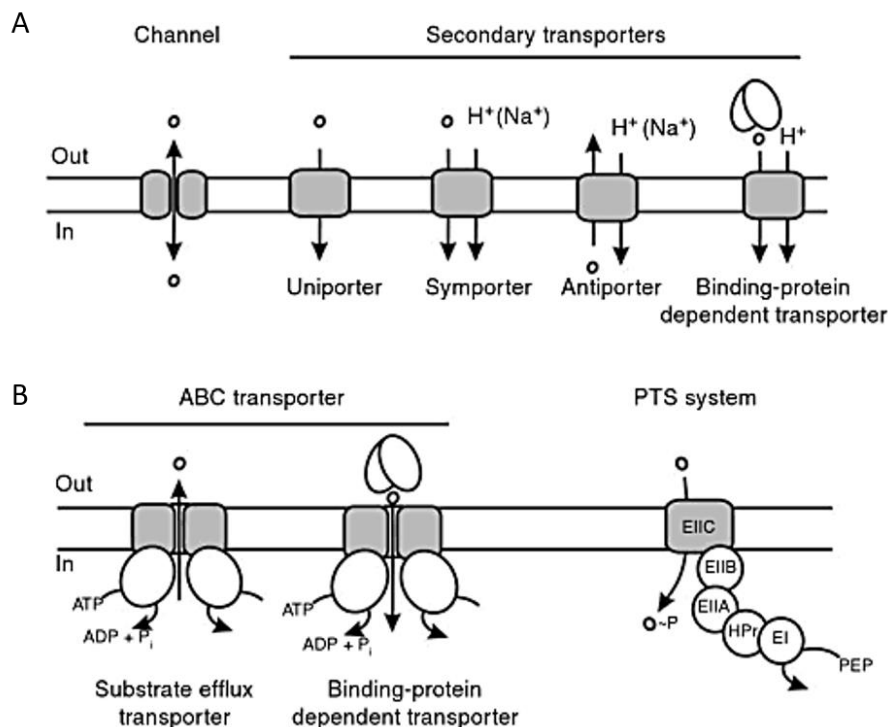


Abbildung 1: Schematische Darstellung der verschiedenen Transporterklassen. (A) Kanäle und verschiedene Formen sekundärer Transporter, (B) ABC-Transporter und das PTS System; in die Membran integrierte Untereinheiten sind in grau dargestellt, O = transportiertes Substrat; (Albers und Driessen, 2008).

1.2 Herausforderungen bei der Arbeit mit Transportproteinen

So vielfältig diese Transportsysteme auch sind, so schwierig ist es auch sie zu untersuchen. Wie eingangs bereits erwähnt, sind Membranproteine, insbesondere Transportproteine, im Vergleich zu löslichen Proteinen nur wenig erforscht. Dies ist nicht zuletzt dem Umstand geschuldet, dass diese Proteine eine relativ hydrophobe Oberfläche aufweisen und nur durch zu Hilfenahme von Detergenzien aus den Membranen herausgelöst werden können. Zudem sind sie oft sehr labil und ihre Strukturen meist sehr flexibel (Carpenter *et al.*, 2008). Dies führt auf allen Ebenen der Proteinanalyse, von der Expression über die Solubilisierung und Reinigung bis hin zur Strukturdetermination, zu Schwierigkeiten.

Die erste Hürde stellt schon die Wahl eines geeigneten, heterologen Expressionssystems dar. Das Gram-negative Bakterium *Escherichia coli* ist mit über 88 % der am häufigsten genutzte Wirt. Insektenzelllinien werden zu circa 4,5 % und Säugetier-Zelllinien zu 2,5 % eingesetzt. Den restlichen Anteil nehmen heterologe Expressionen in Hefezellen (2 %) und anderen Systemen (2 %), wie z.B. Expressionen in alternativen prokaryotischen Wirten (*Bacillus*, *Pseudomonas*, *Halobacterium*) oder Zell-freien Systemen, ein (Fernández und Vega, 2013).

Dass die Wahl so häufig auf *E. coli* fällt, liegt unter anderem an der einfachen Handhabung, den geringen Kosten, der hohen Produktivität und der Vielzahl an vorhandenen Plasmiden und Stämmen. Allerdings fehlt in *E. coli* und auch anderen prokaryotischen Systemen die Möglichkeit zu posttranslationalen Modifikationen. Diese umfassen vor allem Glykosylierungen, Phosphorylierungen oder Prenylierungen und sind für Proteine eukaryotischen Ursprungs von enormer Bedeutung. Deswegen wird in vielen Fällen an Stelle bakterieller Wirte auf Hefesysteme oder Zellkulturlinien zurückgegriffen. Der Einsatz von Hefen (*Pichia pastoris* oder *Saccharomyces cerevisiae*) vereint die Vorteile eines eukaryotischen Systems mit einer dennoch einfachen Handhabung, hohen Wachstumsraten und effizienten genetischen Werkzeugen. Zellkulturlinien, sowohl aus Säugetieren und Insekten, zählen auf Grund ihrer Komplexität zu den höheren eukaryotischen Systemen und die posttranslationalen Modifikationsmöglichkeiten sind dementsprechend vielfältiger. Allerdings ist die Expression in Zellkulturlinien deutlich aufwendiger und dadurch auch teurer. Zudem können die Zellen im Vergleich zu *E. coli* oder *P. pastoris* nur in geringeren Dichten gezüchtet werden, wodurch die Menge an rekombinant hergestelltem Protein verhältnismäßig reduziert ist (Junge *et al.*, 2008). Generell gibt es auch Unterschiede hinsichtlich der Lipidkomposition der Wirtszelle, was vor allem für die Expression von Membranproteinen von Bedeutung ist. Diese sind in biologischen Membranen lokalisiert, also in einer Umgebung aus Lipiden verankert. In Prokaryoten sind vor allem Phospholipide wie Phosphatidylethanolamin (PE) oder Cardiolipin (CL) und Glykolipide wie Phosphatidylglycerol (PG) zu finden. In Bakterien sind die Lipide meist mittels Esterbindungen verknüpft, in Archaeen hingegen

werden Etherverbindungen genutzt. Eukaryotische Membranen weisen zusätzlich Sterole wie z.B. Cholesterol und Sphingolipide auf. Wie schon mehrfach gezeigt werden konnte, sind Lipide nicht nur für die Aktivität von Membranproteinen, sondern auch für deren korrekte Faltung, Stabilität und die Orientierung von Transmembranhelices verantwortlich (zusammengefasst in Opekarová und Tanner, 2003). Da Lipide oft als Cofaktoren fungieren, kann auch die Lipidzusammensetzung der Membran des jeweiligen Expressionswirtes den Erfolg der rekombinanten Proteinherstellung beeinflussen und sollte im Vorfeld berücksichtigt werden.

Bei jeder heterologen Expression von Membranproteinen stellt die Tatsache, dass die zellulären Maschinerien der Wirtsorganismen, von der Polypeptidsynthese bis hin zu den Translokationssystemen, für die Herstellung und weitere Prozessierung des rekombinanten Konstrukts vereinnahmt werden, eine enorme Herausforderung dar (Bill und von der Haar, 2015). Einerseits muss der zelleigene Bedarf für Wachstum und Vermehrung über diese Systeme gedeckt werden, zum anderen soll eine Überproduktion des Zielproteins stattfinden. Gerade für Proteine, die zudem in die Membranen der Wirtszellen eingebaut werden müssen, kann oftmals keine Balance gefunden werden und ihre Expression ist daher toxisch oder resultiert in falsch gefaltetem oder degradiertem Protein.

Eine weitere Hürde stellt die Reinigung von Membranproteinen dar. Nach einer erfolgreichen Expression muss das Protein zunächst aus der Membran herausgelöst und dabei in löslicher Form gehalten werden. Dafür werden Detergenzien eingesetzt, welche durch ihren amphiphilen Charakter in wässriger Lösung spontan Mizellen formen, in die die Membranproteine aufgenommen werden können (Almgren, 2000; Seddon *et al.*, 2004). Dabei lagern sich die hydrophoben Anteile des Detergenz zusammen und interagieren mit den ebenfalls hydrophoben TMHs der Proteine. Die hydrophilen Kopfgruppen der Detergenzmoleküle orientieren sich nach außen. Die minimale Konzentration, die für die spontane Bildung von Mizellen nötig ist, wird als kritische Mizellenkonzentration (*critical micelle concentration*, CMC) bezeichnet. Dieser Wert ist für jedes Detergenz unterschiedlich und wird außerdem durch Faktoren wie Temperatur, pH oder Ionenstärke beeinflusst (le Maire *et al.*, 2000). Der polare Anteil des Detergenz kann entweder geladen (anionische oder kationische Detergenzien), elektrisch neutral oder zwitterionisch sein und hat unter anderem auch Auswirkungen auf die jeweilige Solubilisierungseffizienz. Ein ideales Detergenz sollte das Zielprotein wirksam aus der Membran heraus lösen, so dass dessen native, funktionelle Konformation vollständig erhalten bleibt. Auch die Solubilisierung muss für jedes Protein eigens optimiert werden. Durch die Vielzahl der mittlerweile erhältlichen Detergenzien und durch zahlreiche Variationsmöglichkeiten an Reinigungsmethoden und -bedingungen ist gerade dieser Schritt eine weitere Schlüsselstelle im Hinblick auf die Charakterisierung von Membranproteinen.

Ein weiteres wichtiges Werkzeug, um die biologische Funktion und die molekularen Mechanismen von Transportvorgängen verstehen zu können, ist die Strukturbestimmung von Membranproteinen. Dafür benötigt man nicht nur ausreichende Mengen (5–20 mg/ml) des Zielproteins, sondern auch homogene und reine Proteinproben. Demnach sind dafür eine optimale Expression und Reinigung, wie oben beschrieben, von grundlegender Bedeutung. Die Röntgenstrukturanalyse kann zur Bestimmung der 3D-Struktur von Proteinkristallen genutzt werden. Allerdings ist der Einsatz dieser Methode gerade für Membranproteine nicht trivial. Viele verschiedene Faktoren beeinflussen die Kristallisation von Proteinen, die geeigneten Bedingungen sind nicht vorhersehbar und es kann in einzelnen Fällen sogar Jahre dauern bis sich Proteinkristalle entwickeln. Durch Mutationen, Deletionen, sowie verschiedene Fusions- oder Bindepartner (z.B. Fab-Fragmente; Griffin und Lawson, 2011) kann die Stabilität des Zielproteins für die Kristallisation oftmals verbessert werden und auch die Entwicklung neuer Techniken, wie HiLiDe (Gourdon *et al.*, 2011) oder der Einsatz von Microfocus Beam Lines, haben die Quote gelöster Proteinstrukturen gesteigert (Bill *et al.*, 2011). Abgesehen von der Röntgenstrukturanalyse können auch noch andere Methoden zur Strukturbestimmung von Membranproteinen genutzt werden. Hierzu zählen NMR-Spektroskopie (Nuclear Magnetic Resonance), Elektronenmikroskopie (2D-Kristalle, Kryo-EM, Single Particle Analysen) oder auch Einzelmolekülfluoreszenzspektroskopie in Verbindung mit Förster-Resonanz-Energie-Transfer (FRET). Jede dieser Methoden hat ihre Vor- und Nachteile. Für die Röntgenstrukturanalyse werden Proteine im kristallinen Zustand benötigt. Es gibt dabei nahezu keinerlei Größenbeschränkung, sodass die Untersuchung von Proteinen bis zu mehreren 100 kDa ist möglich. Es können dabei zwar sehr hohe Auflösungen (bis zu 1 Å) erzielt werden, jedoch lassen sich viele Proteine nicht kristallisieren. Darüber hinaus zeigen Kristalle immer nur eine statische Momentaufnahme, weshalb keine dynamischen Vorgänge beobachtet werden können. Mit Hilfe der NMR-Spektroskopie ist eine Analyse von Proteinen in ihrem nativen Zustand möglich. Einerseits ist dafür keine Kristallisation notwendig, da die Proteine direkt in Lösung auf molekularer Ebene untersucht werden können. Andererseits können zusätzlich zur Strukturaufklärung auch dynamische Prozesse wie die Veränderungen der Proteinstruktur oder Bindungsvorgänge beobachtet werden. Auch die Auflösung der NMR-Spektroskopie ist sehr gut (2–5 Å). Allerdings sind auch für diese Methode die Anforderungen an die Qualität der Proteine sehr hoch. Es werden extrem reine Proben in ausreichender Menge (> 10 mg) benötigt. Einen limitierenden Faktor stellt außerdem die geringe Empfindlichkeit der Methode dar. Es können nur Proteine bis zu einer maximalen Größe von 30–40 kDa untersucht werden (Snyder *et al.*, 2005). Das Auflösungsvermögen elektronenmikroskopischer Methoden ist im Vergleich zu NMR oder Röntgenstrukturanalyse meist geringer (8–15 Å). Es können zudem nur größere Moleküle (> mehrere 100 kDa) untersucht werden. Der Vorteil besteht jedoch darin, dass der native Zustand der Proteine erhalten bleibt. Es werden nur

geringe Mengen benötigt (0,5–1 mg/ml) und auch eine Untersuchung heterogener Proben ist möglich (Ubarretxena-Belandia und Stokes, 2010). Methoden wie die Kryoelektronenmikroskopie in Kombination mit einer Einzelteilchenanalyse (*single particle analysis*) haben sich deshalb für die Strukturaufklärung großer makromolekularer Komplexe etabliert. Lassen sich 2D-Kristalle, z.B. in Gegenwart nativer Lipide, gewinnen, kann mit Hilfe der Elektronenkristallographie ein Strukturmodell erstellt werden (Kühlbrandt und Williams, 1999). Mit einem hochauflösenden Elektronenmikroskop werden Bilder der 2D-Kristalle aufgenommen, diese digitalisiert und mit den gewonnenen Daten ein dreidimensionales Modell erzeugt. Gerade für Membranproteine, die nur in geringer Menge (wenige mg) isoliert werden können, ist die 2D-Kristallisation sehr vielversprechend. Mittels Einzelmolekül-FRET Messungen können intra- sowie intermolekulare Distanzen bestimmt und dynamische Konformationsänderungen von Molekülen beobachtet werden (Raicu und Singh, 2013). Die Daten können z.B. für die Evaluierung von Modellen und Funktionsmechanismen verwendet werden. Denn auch die Erstellung von Homologiemodellen wird häufig zur Vorhersage dreidimensionaler Strukturen herangezogen. Dabei dienen gelöste Strukturen homologer Proteine, die eine möglichst hohe Sequenzidentität mit dem Zielprotein aufweisen sollten, als Vorlage (Tramontano, 1998; Sánchez *et al.*, 2000). Man geht davon aus, dass Proteine mit gemeinsamen evolutionären Vorfahren sich sowohl in der Aminosäuresequenz als auch in ihrer dreidimensionalen Struktur gleichen. Am Computer wird anhand von bereits gelösten Strukturen von homologen Proteinen ein 3D-Modell für das Zielprotein erstellt. Im Wesentlichen wird bei dieser bioinformatischen Methode zunächst ein oder mehrere geeignete Templates in der Proteindatenbank (PDB) gesucht. Danach wird auf Grund von optimierten Sequenzalignments ein „Proteinrückgrat“ erstellt. Da sich in den Sequenzalignments immer wieder Lücken, verursacht durch Insertionen oder Deletionen, ergeben, werden diese Abschnitte durch sogenanntes Loop Modeling modelliert. Für die fehlenden Sequenzbereiche wird in den Datenbanken nach passenden Strukturen gesucht. Auch die Ausrichtung der Seitenketten muss bestimmt werden. Nach ein paar weiteren Schritten zur Verbesserung des Modells (z.B. Geometrieoptimierung, Minimierungsverfahren) muss die fertige Struktur validiert werden, um die Qualität des Homologiemodells bewerten zu können. Neben stereochemischen Parametern können dafür auch energetische Betrachtungen herangezogen werden (Martí-Renom *et al.*, 2000).

1.3 Archaeelle Membrantransportsysteme: Sequenz und Funktion

Die bioinformatische und biochemische Untersuchung von Transportproteinen spielt für die Aufklärung vieler unbekannter physiologischer Prozesse, die sich in Mikroorganismen abspielen, eine entscheidende Rolle. Ist das Genom eines Organismus sequenziert, kann anhand der Sequenz eine Zuordnung von Proteinfunktionen vorgenommen werden. Dabei ist es jedoch keine Seltenheit, dass sowohl lösliche als auch membrangebundene Proteine falsch annotiert werden. In der Regel übernehmen automatische Programme die funktionelle Zuordnung von Genen. Dabei werden allerdings häufig Fehlannotationen generiert, welche in öffentlichen Datenbanken hinterlegt und nicht weiter überprüft werden. In einer Studie von Schnoes *et al.* (2009) wurde die Höhe der Fehlannotationen für 37 Enzymfamilien, aus sechs Superfamilien stammend, in vier unterschiedlichen Datenbanken (Swiss-Prot, GenBank NR, TrEMBL und KEGG) untersucht. Die manuell annotierte Datenbank Swiss-Prot wies die geringste Fehlerhöhe (fast 0 %) auf. Die anderen drei Datenbanken zeigten für die verschiedenen Superfamilien zum Teil Missannotationsraten von 25–60 %. Dabei wurden die untersuchten Proteine entweder einer falschen, jedoch oft sehr ähnlichen Familie, oder nur einer übergeordneten Superfamilie, nicht aber der richtigen Unterfamilie, zugeordnet. Teilweise beruhten die Missannotationen auf Fehlern in den Aminosäuresequenzen der hinterlegten Proteine. Generell ist also eine manuelle Annotation von Genomen weniger fehleranfällig, als rein computergestützte Ansätze. Hierbei ist allerdings zu beachten, dass öffentlich zugängliche und veränderbare Datenbanken auch falsche Proteinsequenzen beinhalten können.

Gerade für archaeelle Proteine ist eine rein computergestützte Genomannotation zudem oft unzulänglich, da viele Programme auf Ergebnissen bakterieller Homologe basieren. Diese sind im Allgemeinen besser untersucht, da Bakterien (bis jetzt) eine höhere medizinische Relevanz aufweisen und viele Modelorganismen (z.B. *E. coli*, *B. subtilis*) seit Jahrzehnten Gegenstand intensiver Forschungen sind. Archaeen unterscheiden sich aber in vielerlei Hinsicht von der Domäne der *Bacteria*. So verwenden Archaeen beispielsweise andere Lipide und die Zellwände werden anstelle von Peptidoglykan aus Pseudomurein oder Proteinen (S-Layer) gebildet. Vor allem das Fehlen eines Zellkerns sowie ähnliche Stoffwechselwege verbinden Bakterien und Archaeen. Für zentrale molekulare Prozesse, wie Transkription und Translation, finden sich dagegen zahlreiche Parallelen zwischen Archaeen und Eukaryoten. Überraschenderweise gibt es auch für archaeelle Membranproteine, vor allem für sekundäre Transporter, nicht selten eukaryotische Homologe. Durch diese erstaunliche Ähnlichkeit ist es möglich, archaeelle Transporter als Modelle für Transportprozesse in Säugetieren zu verwenden. Ein erfolgreiches Beispiel hierfür stellt der Aspartat-Transporter Glt_{Ph} von *Pyrococcus horikoshii*, ein enges Homolog des menschlichen Glutamat-Transporters, dar (Yernool

et al., 2004). Dennoch liegen die Sequenzähnlichkeiten zwischen eukaryotischen und archaeellen Transportern bei unter 30 %, weshalb nicht alle Fragestellungen hundertprozentig gelöst werden können.

Die TransportDB (Ren *et al.*, 2004) gibt einen Überblick über alle vorhergesagten cytoplasmatischen Transportproteine von vielen Organismen, deren vollständige Genomsequenzen verfügbar sind. Es wurden insgesamt 288 Bakterien, 49 Eukaryoten und 28 Archaeen erfasst. In dieser relationalen Datenbank sind funktionelle Vorhersagen zu den jeweiligen Proteinsequenzen abrufbar und die Transporter wurden zudem in Proteinfamilien, gemäß dem TC-Klassifikationssystem (Saier *et al.*, 2006), eingeteilt.

Eine Zusammenfassung dieser Informationen für archaeelle Transportproteine beinhaltet neben Genomgröße und Anzahl der Transportproteine auch die prozentualen Anteile der drei wichtigsten Transportertypen: primäre (ATP-abhängige) Transporter, sekundäre Transporter und Ionenkanäle (Tab. 1). In den meisten Organismen (19 von 28 ≈ 70 %) stellen die sekundären Transporter den größten Anteil. Neben der Gesamtzahl der gefundenen Proteinfamilien sind die drei am häufigsten auftretenden Superfamilien (MFS, DMT und MOP) angegeben. In manchen Fällen ist ein „x“ oder die Angabe „b.t.“ (*beyond threshold*) vermerkt. Dies bedeutet, dass die Superfamilie gemäß Genomannotation bei dem jeweiligen Organismus fehlt (x) oder Transporter dieser Superfamilie zwar im Genom vorhanden sind, jedoch nicht zu den drei am häufigsten auftretenden Superfamilien sekundärer Transporter zählen (b.t.). Proteine der Major Facilitator Superfamilie sind mit einer Ausnahme (*N. equitans*) in allen hier ausgewählten Archaeen zu finden und machen auch bei fast allen Organismen (23 von 27 ≈ 85 %) den größten Anteil aus. Sie katalysieren den Substrattransport durch Membranen, in dem sie sich die Energie bestehender elektrochemischer Gradienten zu Nutze machen. Die Liganden werden auf einer Seite der Membran gebunden und durch Konformationsänderungen des Transporters auf der anderen Seite wieder entlassen (Boudker und Verdon, 2010).

Tabelle 1: Überblick über vorhergesagte Transportproteine der Cytoplasmamembran von verschiedenen Archaeen. Für jeden Organismus ist die Genomgröße und die Anzahl der Transportproteine pro Mb Genom gezeigt. Der prozentuale Anteil ATP-abhängiger Transporter, Ionenkanäle und sekundärer Transporter wurde von der Gesamtanzahl aller Transportproteine kalkuliert. Der zweite Teil der Tabelle beinhaltet detailliertere Informationen zu den sekundären Transportern: Darstellung der Anzahl verschiedener Familien sowie Angabe des prozentualen Anteils der drei am häufigsten auftretenden Familien; "x" = Transporter dieser Familie fehlen dem jeweiligen Organismus (gemäß Genomannotation); "b.t." = Transporter dieser Familie sind zwar im Genom vorhanden, zählen jedoch nicht zu den drei am häufigsten auftretenden Familien sekundärer Transporter im jeweiligen Organismus; TP = Transportprotein; b.t. = beyond threshold; MFS = Major Facilitator Superfamilie; DMT = Drug/Metabolite Transporter Superfamilie; MOP = Multidrug/Oligosaccharid-lipid/Polysaccharide Flippase Superfamilie, [Rohdaten: <http://www.membranetransport.org/>; Oktober 2015].

	Genomgröße [Mbp]	Anz. TPs	Anz. TPs pro Mb Genom	ATP-abhängige TPs	Ionen- kanäle	2° Transporter	2° Transporter Familien	MFS	DMT	MOP
<i>Methanospirillum hungatei</i>	3,54	270	76,3	70 %	4 %	23 %	21	20,6 %	b.t.	8,0 %
<i>Pyrobaculum aerophilum</i>	2,22	78	35,1	60 %	5 %	32 %	10	48,0 %	12,0 %	x
<i>Aeropyrum pernix</i>	1,67	78	46,7	55 %	4 %	37 %	17	24,0 %	14,0 %	7,0 %
<i>Nitrosopumilus maritimus</i>	1,00	54	54,0	39 %	18 %	39 %	16	9,5 %	9,5 %	b.t.
<i>Methanosarcina acetivorans</i>	5,75	214	37,2	48 %	9 %	40 %	26	16,5 %	b.t.	15,3 %
<i>Nanoarchaeum equitans</i>	0,50	10	20,0	30 %	30 %	40 %	4	x	x	25 %
<i>Methanobacterium thermoaut.</i>	1,75	66	37,7	39 %	12 %	42 %	17	10,7 %	7,1 %	25,0 %
<i>Haloarcula marismortui</i>	4,27	173	40,5	43 %	7 %	44 %	29	6,5 %	9,1 %	9,1 %
<i>Staphylothermus marinus</i>	1,00	82	82,0	45 %	8 %	45 %	18	21,6 %	13,5 %	b.t.
<i>Methanosarcina mazei</i>	4,10	165	40,2	38 %	8 %	47 %	25	9,1 %	11,7 %	18,2 %
<i>Methanocaldococcus jann.</i>	1,66	122	73,5	35 %	14 %	49 %	22	6,7 %	b.t.	11,7 %
<i>Haloferax volcanii</i>	4,20	200	47,6	38 %	7 %	50 %	29	15,0 %	9,0 %	9,0 %
<i>Pyrococcus furiosus</i>	1,91	102	53,4	41 %	5 %	50 %	21	19,6 %	13,7 %	9,8 %
<i>Methanococcus maripaludis</i>	1,66	88	53,0	37 %	10 %	51 %	25	13,3 %	6,7 %	13,3 %
<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	2,18	104	47,7	36 %	8 %	52 %	23	26,0 %	15,0 %	b.t.
<i>Natronomonas pharaonis</i>	2,74	120	43,6	36 %	8 %	52 %	26	20,6 %	b.t.	6,3 %
<i>Methanopyrus kandleri</i>	1,69	36	21,3	31 %	14 %	53 %	15	10,5 %	b.t.	b.t.
<i>Thermococcus kodakarensis</i>	2,09	116	55,5	40 %	3 %	53 %	23	25,8 %	12,9 %	8,1 %
<i>Halobacterium sp.</i>	2,57	104	40,5	40 %	5 %	55 %	24	14,0 %	b.t.	12,3 %
<i>Pyrococcus abyssi</i>	1,77	89	50,3	36 %	2 %	60 %	22	22,6 %	11,3 %	9,4 %
<i>Pyrococcus horikoshii</i>	1,80	92	51,1	37 %	3 %	60 %	23	21,8 %	12,7 %	9,1 %
<i>Sulfolobus solfataricus</i>	2,99	127	52,5	31 %	5 %	64 %	16	55,6 %	b.t.	x
<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	2,23	115	51,6	29 %	5 %	66 %	18	59,2 %	3,9 %	b.t.
<i>Thermoplasma acidophilum</i>	1,56	105	67,3	28 %	5 %	67 %	15	48,6 %	7,0 %	b.t.
<i>Sulfolobus tokodaii</i>	2,81	133	47,3	29 %	3 %	68 %	16	48,9 %	6,7 %	b.t.
<i>Thermoplasma volcanium</i>	1,58	115	72,8	24 %	4 %	70 %	11	58,0 %	3,7 %	x
<i>Metallorphaera sedula</i>	2,00	131	65,5	23 %	5 %	72 %	18	53,3 %	4,3 %	b.t.
<i>Picrophilus torridus</i>	1,55	114	73,6	23 %	3 %	74 %	14	60,7 %	3,6 %	b.t.

1.4 Transporter der Major Facilitator Superfamilie

Die Major Facilitator Superfamilie stellt die größte Gruppe innerhalb der sekundären Transporter und ist in allen drei Domänen des Lebens zu finden. Ihr Substratspektrum reicht von einfachen Monosacchariden über Oligosaccharide bis hin zu Aminosäuren, Peptiden, Vitaminen, Enzymen, Nukleosiden und vielen weiteren Substanzen (Reddy *et al.*, 2011). MFS Transporter bestehen meist aus 12 Transmembran- α -Helices, die durch hydrophile Loops miteinander verbunden werden (Pao *et al.*, 1998). Sowohl N- als auch C-Terminus liegen auf der cytoplasmatischen Seite. Auch wenn die über 10000 sequenzierten Mitglieder dieser Familie untereinander nur geringe Sequenzähnlichkeiten, unterschiedliche Substratspezifitäten und Kopplungsmechanismen aufweisen, teilen sie alle ein gemeinsames strukturelles Merkmal: den sogenannten MFS-Fold. Immer drei der insgesamt 12 TMHs bilden eine funktionelle Einheit und je zwei dieser funktionellen Einheiten lagern sich invers zu einer Domäne zusammen. Erst durch Zusammenlagerung beider Domänen entsteht ein vollständiger MFS Transporter (Abb. 2; Yan, 2013).

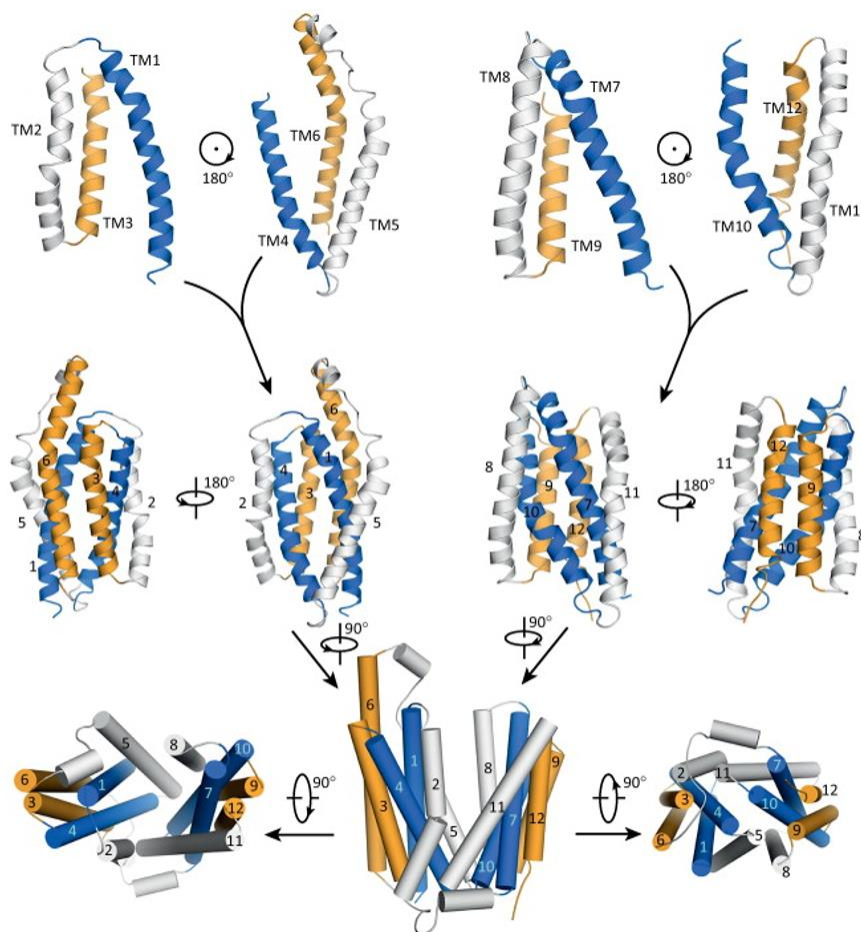


Abbildung 2: Bildung des MFS-Folds. Der MFS-Fold wird aus je 3 TMHs (funktionelle Einheiten, obere Reihe), die sich invers zu Domänen (mittlere Reihe) zusammenlagern, gebildet. Durch Zusammenlagerung zweier Domänen entsteht der vollständige MFS Transporter (untere Reihe), übereinstimmende TMHs in den funktionellen Einheiten sind in denselben Farben gekennzeichnet (aus Yan, 2013).

In allen MFS Proteinen liegen Helix 1, 4, 7 und 10 im Zentrum des Transporters, wodurch die Mehrheit der essentiellen Aminosäuren, die für die Positionierung des jeweiligen Substrates und den eventuellen Kopplungsmechanismus des Cotransportes zuständig sind, auch entsprechend positioniert werden. Helix 2, 5, 8 und 11 sind in der Struktur seitlich angeordnet und hauptsächlich für die Herstellung der Kontakte zwischen den Domänen verantwortlich. Helix 3, 6, 9 und 12 liegen ganz außen und umschließen das Zentrum des Transporters. Sie sind für die strukturelle Integrität in der Membran von Bedeutung (Yan, 2013). Obwohl die MFS Proteine untereinander nur geringe Sequenzähnlichkeiten aufweisen, gibt es jedoch ein konserviertes Motiv (*DRXXRR*), welches an den cytoplasmatischen Enden von TMHs 2 und 3 sowie 8 und 9 gefunden werden kann (Law et al., 2008). Der Substrattransport erfolgt über den „Alternating Access“ Mechanismus (vereinfacht in Abb. 3 dargestellt) und wird im Falle der MFS Transporter auch als „Rocker-Switch“ Mechanismus bezeichnet.

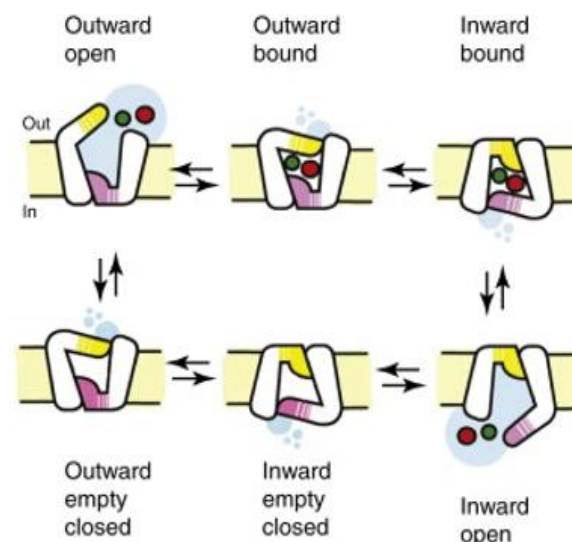


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Transportvorganges nach dem „Alternating Access“ Mechanismus. Dargestellt ist ein Symportvorgang: das Substrat (rot) wird zusammen mit einem Ion (grün) transportiert. Der Zyklus startet mit einer nach außen geöffneten Konformation (Outward-open) des Transporters, nach Substratbindung wird der Transporter „geschlossen“ und geht in die nach innen geöffnete Konformation (Inward-open) über. Das Substrat wird schließlich entlassen und der Transporter geht wieder in die ursprüngliche Konformation zurück (aus Boudker und Verdon, 2010).

Die Substratbindestelle, im Zentrum des Transporters gelegen, ist entweder zum intra- oder extrazellulären Raum hin geöffnet (*outward-facing*). Dementsprechend ist der Transporter zur jeweils anderen Seite hin geschlossen. Sobald eine Substratbindung erfolgt, wird die Substratbindestelle „geschlossen“ (*occluded*), der Transporter ändert seine Konformation und das Substrat wird durch die Membran transportiert. Auf der anderen Seite öffnet sich der Transporter wieder (*inward-facing*) und das Substrat kann entlassen werden. Danach nimmt der Transporter wieder seine Ausgangskonformation ein und die Substratbindung kann erneut erfolgen. Die Substratbindestelle wird also alternierend nur auf jeweils einer Seite der Membran zugänglich gemacht.

1.5 *Ignicoccus hospitalis*: Modellsystem für Funktionelle Kompartimentierung

Die Komplexität von Transportmechanismen hängt zum Teil auch von der Komplexität der verschiedenen Organismen ab. Eukaryoten haben eine Vielfalt subzellulärer Membransysteme und Kompartimente wie zum Beispiel den Zellkern, das Endoplasmatische Retikulum, die Mitochondrien, den Golgi-Apparat, die Plastide oder die Peroxisomen. Deshalb ist es notwendig den Stofftransport stärker zu differenzieren und zu koordinieren (Wickner und Schekman, 2005). Eukaryoten besitzen im Vergleich zu Prokaryoten auch eine höhere Anzahl an Transportproteinen (Ren und Paulsen, 2005). Prokaryoten sind im Allgemeinen weniger vielfältig kompartimentiert. Zur Erhöhung der Reaktionsoberfläche für metabolische Reaktionen gibt es zwar z.T. intracytoplasmatische Membransysteme, wie sie z.B. in Methanotrophen und Organismen der Gattung *Nitrosomonas* und *Nitrosococcus* zu finden sind (van Niftrik *et al.*, 2004) oder Strukturen wie das Periplasma Gram-negativer Bakterien. Die wesentlichen Transportvorgänge sind jedoch auf die Cytoplasmamembran beschränkt.

Eine Ausnahme dazu stellt das hyperthermophile Archaeum *Ignicoccus hospitalis* dar. Anders als die meisten Prokaryoten besitzt dieser Organismus nicht nur eine Cytoplasmamembran (als Inner Membrane (IM) bezeichnet), sondern auch eine zusätzliche zweite Membran, die als Outer Cellular Membrane (OCM) bezeichnet wird. Sie umschließt das sogenannte Intermembran-Kompartiment (IMC), welches nur auf den ersten Blick dem Periplasma Gram-negativer Bakterien ähnelt (Abb. 4 A; Rachel *et al.*, 2002; Paper *et al.*, 2007). Wie von Küper *et al.* (2010) gezeigt werden konnte, sind zwei Transportproteine, welche die gesamte Energiekonservierung des Organismus gewährleisten, in der OCM lokalisiert. Sowohl die primäre Protonenpumpe (H_2 :Schwefel-Oxidoreduktase) als auch die sekundäre Protonenpumpe (ATP-Synthase) sind in der äußeren Zellmembran zu finden und liegen nicht, wie für andere Prokaryoten typisch, in der Cytoplasmamembran (Abb. 4 B). Die H_2 :Schwefel-Oxidoreduktase pumpt Protonen aus dem IMC der Zelle nach außen, wodurch ein elektrochemischer Gradient entsteht und die äußere Zellmembran folglich energetisiert ist. Diesen Gradienten nutzt die ATP-Synthase zur Synthese von ATP aus ADP und anorganischem Phosphat (P_i) im Intermembran-Kompartiment.

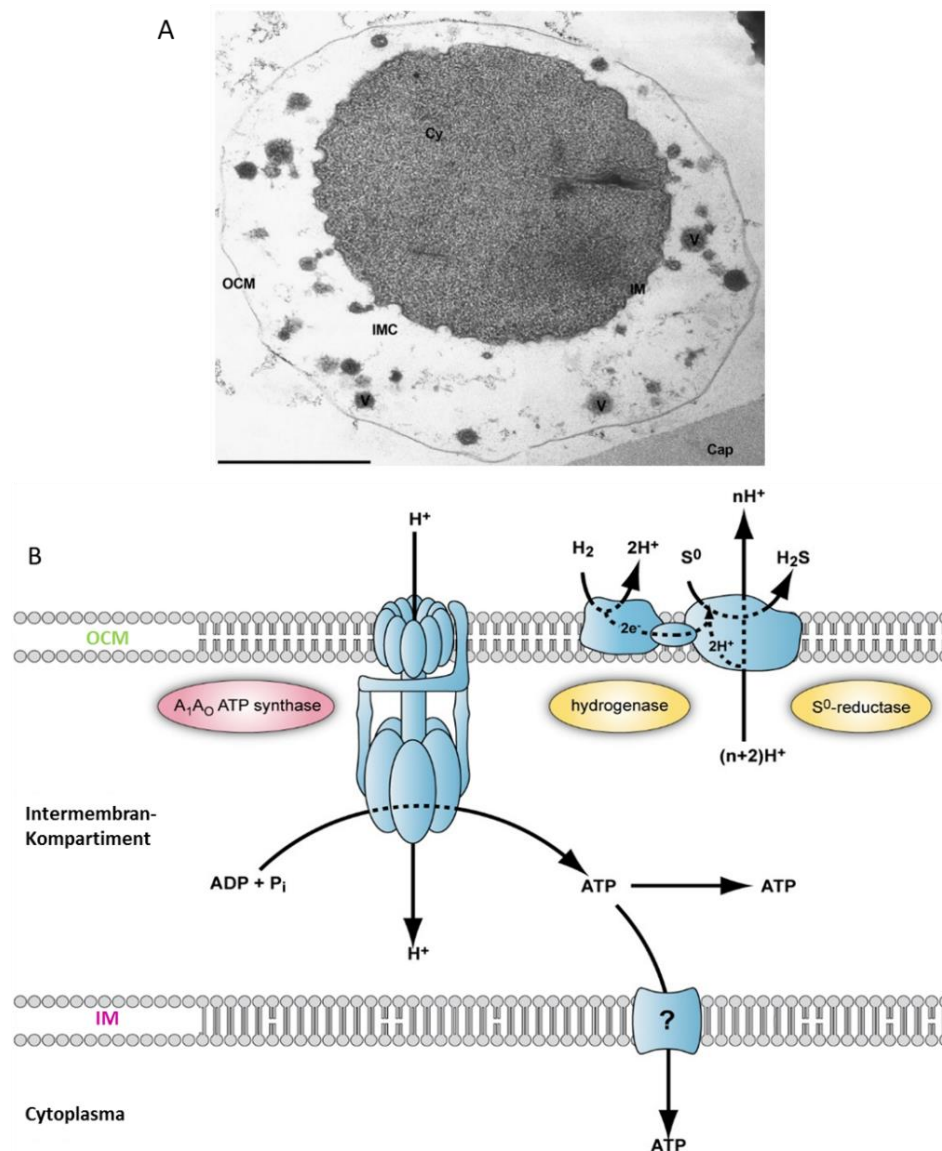


Abbildung 4: Funktionelle Kompartimentierung in *I. hospitalis*. (A) Elektronenmikroskopie einer *I. hospitalis* Zelle, IM = innere Membran, OCM = äußere Zellmembran, IMC = Intermembran-Kompartiment, V = Vesikel, Cy = Cytoplasma, Cap = Cellulose-Kapillare, Balken entspricht 1 µm (Rachel *et al.*, 2010), (B) Schema zur Energiekonservierung durch Transportproteine in der äußeren Zellmembran von *I. hospitalis*: Protonen werden durch die H_2 :Schwefel-Oxidoreduktase transloziert, wodurch ein chemiosmotischer Ionengradient über die äußere Zellmembran entsteht; diesen nutzt die ATP-Synthase zur ATP-Bildung im Intermembran-Kompartiment (adaptiert von Küper *et al.*, 2010).

Diese funktionelle Kompartimentierung ist nicht nur in *I. hospitalis* zu finden, sondern scheint ein Charakteristikum aller Vertreter der Gattung *Ignicoccus* zu sein (Daxer, 2011; Huber *et al.*, 2012). Die Gattung umfasst derzeit drei beschriebene Spezies: *I. islandicus*, *I. pacificus* und *I. hospitalis* (Huber *et al.*, 2000; Paper *et al.*, 2007). Außerdem gibt es einen neu isolierten Vertreter *Ignicoccus* sp. MEX13A („*Ignicoccus morulus*“, Lange, 2009). Alle *Ignicocci* sind der Ordnung *Desulfurococcales* innerhalb des Reichs der *Crenarchaeota* zuzuordnen. Ein optimales Wachstum konnte bei 90 °C und einem pH-Wert von pH 5,5–6,0 beobachtet werden. Die strikt anaerob lebenden Kokken haben einen Zelldurchmesser

von 1–5 µm, treten einzeln oder in Paaren auf und besitzen mehrere Zellanhänge (*fibers*, \varnothing 14 nm), die über kugelartige Strukturen unterhalb der inneren Membran verankert werden (Müller *et al.*, 2009; Meyer *et al.*, 2014). Die Organismen wachsen chemolithoautotroph und gewinnen Energie durch die Reduktion von elementarem Schwefel mit molekularem Wasserstoff als Elektronendonator. Als einzige Kohlenstoffquelle dient dabei CO₂, welches über einen neuartigen Stoffwechselweg, den Dicarboxylat/4-Hydroxybutyrat-Zyklus, fixiert wird (Jahn *et al.*, 2007; Huber *et al.*, 2008). Vor Kurzem wurde ein ähnlicher CO₂-Fixierungsweg im Phylum der *Thaumarchaeota* entdeckt. Allerdings geht man davon aus, dass sich wahrscheinlich beide Wege unabhängig voneinander entwickelt haben (Könneke *et al.*, 2014). Zumindest für *I. hospitalis* konnte gezeigt werden, dass der Organismus geringe Mengen an organischen Säuren wie Acetat, Pyruvat oder Succinat aufnehmen und bis zu 12 % des gesamten Zellkohlenstoffs aus diesen Verbindungen gewinnen kann (Jahn *et al.*, 2007). Für Acetat ist bekannt, dass es über eine AMP-bildende Acetyl-CoA-Synthetase (ACS) aktiviert und in den CO₂-Fixierungsweg eingeleitet und weiter umgesetzt wird (Mayer *et al.*, 2012). Auch die ACS ist in der OCM verankert, womit der Beweis für einen energieverbrauchenden metabolischen Prozess im IMC erbracht wurde. Inzwischen konnte gezeigt werden, dass auch die anderen Stoffwechselreaktionen der CO₂-Fixierung im IMC stattfinden (Flechsler, 2015).

Das IMC enthält zum Teil zahlreiche Vesikel unterschiedlicher Form und Größe, welche sich von der inneren Membran abschnüren oder mit dieser verschmelzen können (Abb. 4A; Rachel *et al.*, 2002). Eine gerichtete Fusion mit der OCM wurde ebenfalls schon beobachtet (Näther und Rachel, 2004). In neueren Arbeiten (Heimerl, 2014) konnte gezeigt werden, dass *I. hospitalis* Zellen ein komplexes endogenes Membransystem besitzen, welches neben dem Cytoplasma zahlreiche membranumschlossene, röhrenförmige Gebilde, jedoch nur wenig freie Vesikel enthält. Überdies wurden im IMC Filamentstrukturen, die möglicherweise eine Art Cytoskelett bilden, gefunden.

Auch die OCM lässt sich noch weiter charakterisieren. Es findet sich darauf kein für Archaeen typischer S-Layer (Huber *et al.*, 2000, Paper *et al.*, 2007) und sie enthält im Gegensatz zur inneren Membran nur Dietherlipide und keine Tetraetherlipide (Jahn *et al.*, 2004). Jedoch enthält die OCM neben den sekundären und primären Protonenpumpen im Fall von *I. hospitalis* den bisher unbekannten Proteinkomplex Ihomp1 (Burghardt *et al.*, 2007). Je zehn Monomere des Proteins oligomerisieren und bilden Porenkomplexe aus, die über die gesamte äußere Zellmembran verteilt sind. Es ist jedoch eher unwahrscheinlich, dass die Poren *in vivo* geöffnet sind und einen ständigen Ionenfluss durch die äußere Zellmembran ermöglichen, da diese energetisiert ist und ein elektrochemischer Gradient aufrecht erhalten werden muss.

1.6 *Ignicoccus hospitalis* und *Nanoarchaeum equitans*: eine „intimate association“

Eine weitere Besonderheit von *I. hospitalis* ist die Tatsache, dass er als einziger Wirtsorganismus für *Nanoarchaeum equitans* gilt (Huber *et al.*, 2002; Huber *et al.*, 2003). *N. equitans* ist obligat auf *I. hospitalis* angewiesen und kann zumindest unter Laborbedingungen nur in Cokultur mit seinem Wirt gezüchtet werden. Zusammen bilden die beiden Archaeen eine sogenannte „intimate association“ (Jahn *et al.*, 2008). Inzwischen wurde ein neuer terrestrischer Vertreter des Phylums der *Nanoarchaeota* im Yellowstone Nationalpark isoliert, welcher eine ähnliche Gemeinschaft mit einem Archaeon (*Acidilobus* sp.) zu bilden scheint (Podar *et al.*, 2013). *N. equitans* Zellen haben einen Durchmesser von lediglich 0,3–0,5 µm und besitzen ein extrem reduziertes Genom (0,49 Mbp). Es fehlen Gene für die Biosynthese von Lipiden, Aminosäuren, Cofaktoren und Nukleotiden (Waters *et al.*, 2003). Dies erklärt die starke Abhängigkeit von *N. equitans* gegenüber seinem Wirt *I. hospitalis*. Es konnte nachgewiesen werden, dass *N. equitans* zumindest Aminosäuren und Lipide, wenn nicht sogar noch weitere Moleküle von seinem Wirt bezieht (Jahn *et al.*, 2004; Jahn *et al.*, 2008). Gene für DNA-Replikation, Transkription, Translation und für Reparaturmechanismen konnten hingegen im Genom gefunden werden. Auch eine rudimentäre ATP-Synthase scheint vorhanden zu sein (Waters *et al.*, 2003). Inwieweit diese aber für eine Energiegewinnung genutzt werden kann oder ob auch die Energie von *I. hospitalis* bezogen wird, ist bis dato nicht geklärt. Es wird jedoch vermutet, dass das Enzym *in vivo* tatsächlich existiert und möglicherweise als ATPase zum Aufbau eines Ionengradienten in freien *N. equitans* Zellen dient (Kreuter, 2014).

Im Gegensatz zu seinem Wirt zeigt *N. equitans* einen für Archaeen typischen Zellwandaufbau bestehend aus einer Cytoplasmamembran und einem aufgelagerten S-Layer (*surface layer*) aus Proteinen (Abb. 5 A; Schuster, 2003). Die Verbindung zu *I. hospitalis* wird über dünne Fasern oder durch direkte Zell-Zell-Kontakte vermittelt (Junglas *et al.*, 2008). Allerdings ist die Kontaktstelle zwischen den beiden Zellen sehr klein (ø 40–170 nm), was detaillierte Untersuchungen erschwert. *N. equitans* Zellen sind bei Anheftung aber vor allem in Regionen des Cytoplasmapols der *I. hospitalis* Zellen zu finden (Abb. 5 B; Junglas *et al.*, 2008; Heimerl, 2014). An diesen Stellen liegen IM und OCM direkt übereinander. Dort konnte auch eine bisher nur vermutete Interaktion, die Fusion der Cytoplasmen beider Zellen, beobachtet werden (Heimerl, 2014). Der S-Layer von *N. equitans* scheint dabei degeneriert zu sein. Außerdem wird vermutet, dass der Proteinkomplex Ihomp1 eine wichtige Rolle für die Verbindung mit *N. equitans* spielt, da er nur bei *I. hospitalis* und nicht bei den anderen Vertretern der Gattung *Ignicoccus* zu finden ist (Burghardt *et al.*, 2007; Daxer, 2011; Huber *et al.*, 2012).

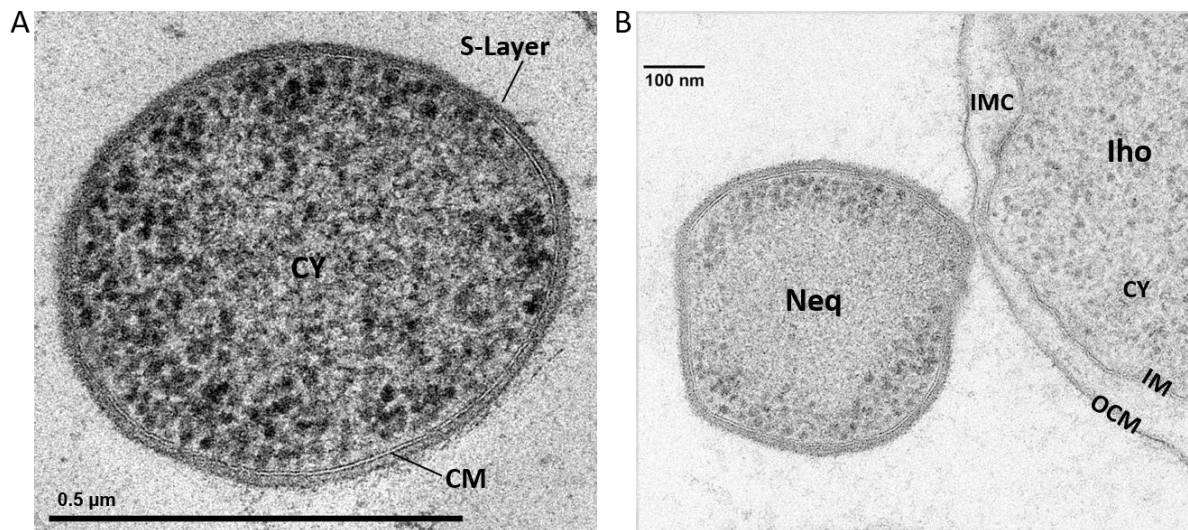


Abbildung 5: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von *N. equitans* (Neq). (A) Aufbau einer *N. equitans* Zelle, CY = Cytoplasma, CM = Cytoplasmamembran (Huber *et al.*, 2002), (B) Kontaktstelle zwischen *N. equitans* und *I. hospitalis* (Iho), das Cytoplasma (CY), die innere Membran (IM), das Intermembran-Kompartiment (IMC) und die äußere Zellmembran (OCM) von *I. hospitalis* stehen in unmittelbarem Kontakt zur Cytoplasmamembran von *N. equitans* (Huber *et al.*, 2012).

Neben *N. equitans* weist auch *I. hospitalis* ein stark reduziertes Genom mit lediglich 1,3 Mbp auf und besitzt damit eines der kleinsten bekannten Genome für einen freilebenden Organismus. So ist es nicht verwunderlich, dass im Genom von *I. hospitalis* nur 1444 Gene und im Genom von *N. equitans* nur 556 Gene für Proteine codieren. Umfassende Analysen des Proteoms beider Organismen zeigten, dass rund 80 % der annotierten Proteine für *I. hospitalis* und etwa 85 % der annotierten Proteine für *N. equitans* tatsächlich in den Organismen detektierbar sind (Giannone *et al.*, 2011; Giannone *et al.*, 2015). Die Anzahl „hypothetischer“ Proteine ist für beide Organismen sehr hoch. In *I. hospitalis* sind rund 20 % der Gene und in *N. equitans* in etwa 30 % der Gene Proteinen mit unbekannter Funktion zuzuordnen. Die Anzahl annotierter Transportproteine ist im Gegensatz dazu sehr gering. Weniger als 3 % des Proteoms von *I. hospitalis* codieren für Transportproteine, in *N. equitans* sind insgesamt nur zehn Transporter annotiert (Podar *et al.*, 2008). Vergleichende Analysen des Proteoms von *I. hospitalis* Reinkulturen mit dem Proteom der Cokultur zeigen, dass die Anzahl der Membranproteine in der Cokultur um 50 % ansteigt. Dabei werden vor allem Proteine, die am Membranaufbau sowie der Energiegewinnung und am Energieumsatz beteiligt sind, aber auch viele Transportproteine hochreguliert. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass *N. equitans* wohl energetisch aber auch metabolisch von *I. hospitalis* abhängt und bisher noch unbekannte Transportvorgänge zwischen beiden Organismen stattfinden müssen. Das Vorhandensein der bereits beschriebenen Cytoplasmapole in Verbindung mit der beobachteten Fusion der Cytoplasmen beider Organismen würde solch einen Austausch ebenfalls erheblich erleichtern.

1.7 Energietransport in *Ignicoccus hospitalis*

Nicht nur Transportvorgänge zwischen *I. hospitalis* und *N. equitans* sind von großem Interesse, sondern auch Transportmechanismen innerhalb einer *I. hospitalis* Zelle selbst sind bisher nahezu unerforscht. Bezug nehmend auf Abbildung 4 B, ist dort nicht nur die Energiekonservierung in *I. hospitalis* dargestellt, sondern es ergibt sich daraus eine weitere Fragestellung in Hinblick auf den ATP-Transport. Das von der ATP-Synthase erzeugte ATP wird im IMC angereichert. Zwar findet dort ein Energieverbrauch (z.B. durch die ACS) statt, doch Prozesse wie Replikation, Transkription oder Proteinbiosynthese benötigen ebenfalls ATP. Diese Vorgänge spielen sich jedoch allesamt im Cytoplasma ab, da dort DNA und Ribosomen lokalisiert sind (Küper *et al.*, 2010). Durch die räumliche Trennung von Energiekonservierung und Informationsprozessierung ist es also zwingend erforderlich, dass ein ATP-Transport aus dem IMC über die innere Membran in das Cytoplasma erfolgt. Gleichzeitig muss ein Rücktransport von ADP und P_i aus dem Cytoplasma in das IMC gewährleistet werden, um dort ausreichend Substrat für die ATP-Synthase zur Verfügung zu stellen. Wie diese Transportprozesse jedoch ablaufen ist bis dato ungeklärt.

1.7.1 Klassische ATP-Transporter

Klassische ADP/ATP-Transporter sind die sogenannten ADP/ATP-Carrier (AAC) oder auch ADP/ATP Translokasen (Duee und Vignais, 1965; Klingenberg 1989). Sie sind in der Mitochondrienmembran von Eukaryoten zu finden und katalysieren den hochspezifischen Transport von ATP aus der Mitochondrien-Matrix heraus. Dabei wird gleichzeitig ADP aus dem Cytoplasma in das Mitochondrium hineingeschleust. Es handelt sich hierbei um einen Antiport, der sicherstellt, dass die im Mitochondrium erzeugte Energie in alle anderen Teile der Zelle gelangt. Im Zusammenspiel mit Phosphat-Carriern wird außerdem das für die ATP-Synthese benötigte P_i im Inneren der Mitochondrien bereitgestellt (Stappen und Krämer, 1994). Die AACs gehören der MC (Mitochondrial Carrier) Familie an. Darüber hinaus weisen alle AACs die für sie typische Konsensussequenz *RRRMMM* auf. Außerdem sind in ihrer Sequenz drei Wiederholungseinheiten (*repeat units*), bestehend aus je 100 Aminosäureresten, zu finden. Jeder Repeat bildet zwei Transmembran- α -Helices aus, die über hydrophile Schleifen (*loops*) verbunden werden (Saraste und Walker, 1982). Die AAC sind als Homodimere aufgebaut, wobei jede Untereinheit wiederum aus drei Repeats besteht (Abb. 6 A–D, H1–H6). Die insgesamt sechs TMHs formen eine Art Faßstruktur mit einer tiefen, kegelförmigen Einbuchtung, welche von außen zugänglich ist, so dass eine Substratbindung stattfinden kann. Die Bindetasche ist für alle bekannten Isoformen des Enzyms konserviert und kann einen maximalen Durchmesser von 20 Å und eine Tiefe von 30 Å erreichen (Pebay-Peyroula *et al.*, 2003). Verschiedene Arginine (R96, R204, R252, R253, und R294) sowie Lysin 38 sind dabei wesentlich an der ADP/ATP Bindung beteiligt (Nelson *et al.*, 1993).

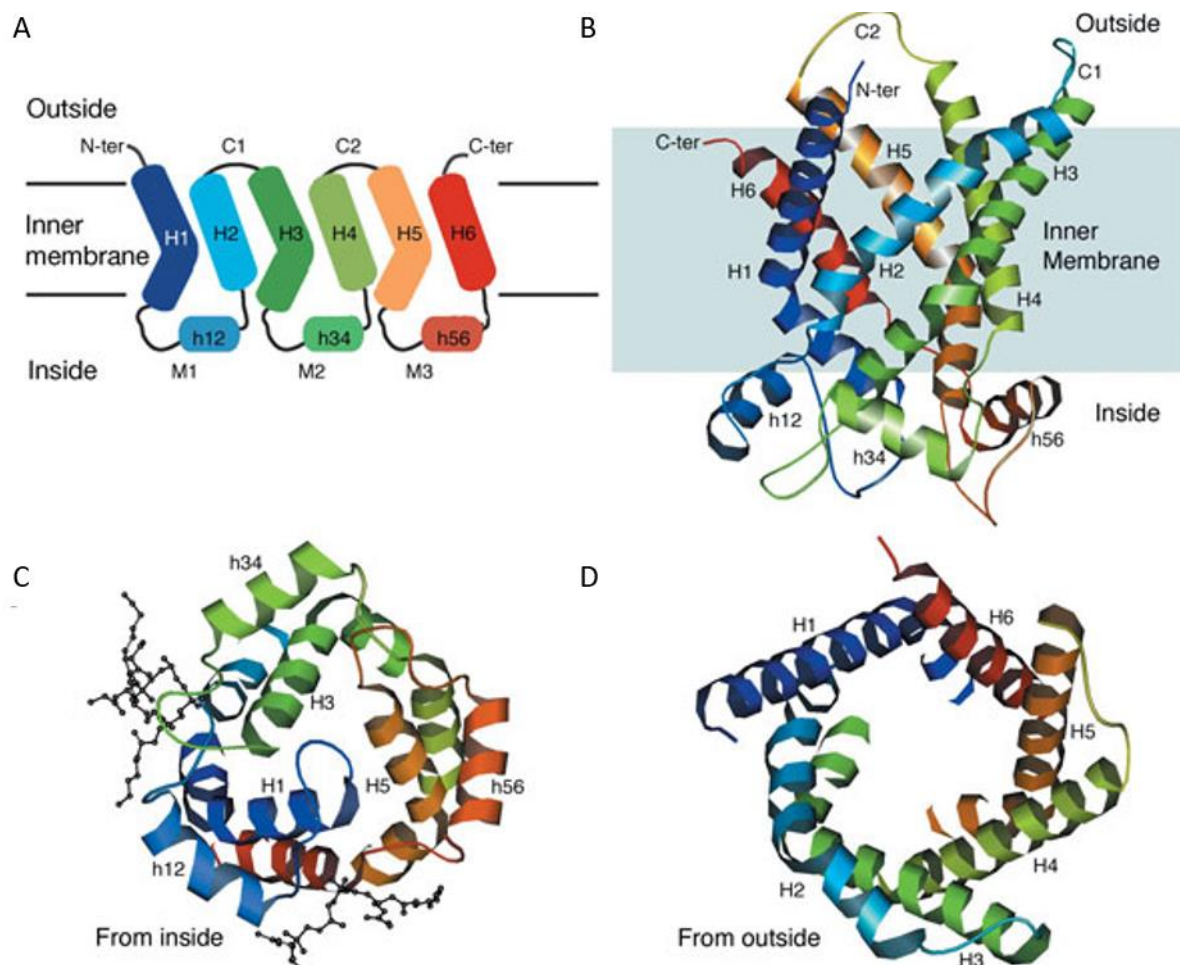


Abbildung 6: Struktur des mitochondrialen ADP/ATP-Carriers. (A) Schematische Darstellung der Sekundärstruktur des ACC, Transmembranhelices (H), Oberflächenhelices (h), Cytoplasma-Loops (C) und Matrix-Loops (M), Inside steht für die Mitochondrien-Matrix, Outside für das Cytoplasma der Mitochondrien, (B) Ribbon-Diagramm des ACCs, dargestellt ist das Monomer in der Seitenansicht vom N-Terminus (blau) zum C-Terminus (rot) (C) Ribbon-Diagramm der Innenansicht des AACs, (D) Ribbon-Diagramm der Außenansicht des AACs (aus Pebay-Peyroula *et al.*, 2003; 1OKC, Auflösung 2,2 Å).

Innerhalb der Prokaryoten sind ADP/ATP-Transporter bisher nur in obligat intrazellulären Parasiten der Gattung *Rickettsia* (Hatch *et al.*, 1982) und *Chlamydia* (Tjaden *et al.*, 1999) bekannt. Dort werden sie als Nukleotid-Transporter (NTTs) bezeichnet und unterscheiden sich sowohl phylogenetisch als auch strukturell und funktionell von den mitochondrialen Carriern (Trentmann *et al.*, 2008). NTTs katalysieren den Import von ATP aus dem Cytoplasma der Wirtszelle in das Innere der „Energie-Parasiten“. Im Gegenzug wird nach Energieverbrauch das ADP zurück in die Wirtszelle transportiert und dort wiederum zu ATP regeneriert. NTTs sind Monomere, die aus 12 TMHs aufgebaut sind und keine Repeat Units aufweisen. Sie gehören zur Familie der ADP/ATP-Antiporter (AAA), die auch einen NTT aus pflanzlichen Plastiden von *Arabidopsis thaliana* (Neuhaus *et al.*, 1997) sowie vier NTTs aus dem parasitischen Einzeller *Encephalitozoon cuniculi* (Tsaousis *et al.*, 2008) mit einschließt. Die Mitglieder dieser Familie weisen untereinander hohe Sequenzidentitäten von 62–66 % auf.

1.7.2 Putativer ATP Transporter in *Ignicoccus hospitalis*?

Im Genom von *I. hospitalis* lassen sich keinerlei Sequenzidentitäten zu den bekannten ACCs oder NTTs feststellen. Da aber laut Transporter Classification Database (TCDB, Saier *et al.*, 2006) die AAA Familie (TC # 2.A.12) entfernt mit Mitgliedern der Major Facilitator Superfamilie (MFS, TC #2.A.1) verwandt ist (siehe auch Reddy *et al.*, 2011), wurde im Genom von *I. hospitalis* nach diesen Transportern gesucht. Wie sich bereits aus der Zusammenstellung der Daten der TransportDB ergab (Tab. 1), stellen die MFS Proteine in allen Domänen des Lebens die größte Superfamilie innerhalb der sekundären Transporter dar. Im Genom von *I. hospitalis* sind insgesamt sechs MFS Transporter annotiert (Iho0302, Iho0391, Iho0409, Iho0555, Iho0800, Iho1008) und sollten im Zuge einer Aufklärung des ATP/ADP Transportes innerhalb einer *I. hospitalis* Zelle untersucht werden.

1.8 Ziele dieser Arbeit

Um die putativen MFS Proteine von *I. hospitalis* untersuchen zu können, sollte zuerst ihre rekombinante Herstellung erfolgen. Da für *I. hospitalis* kein homologes Expressionssystem zur Verfügung steht, sollte die Expression in heterologen Systemen stattfinden. Bis zu Beginn dieser Arbeit wurden noch keine Membranproteine von *I. hospitalis* kloniert und heterolog exprimiert. Von daher bestand ein wesentlicher Teil der Arbeit darin, ein effizientes Expressionssystem für Membranproteine von *I. hospitalis* zu finden und zu etablieren. Dabei wurden sowohl verschiedene prokaryotische (*Escherichia coli*, *Pyrococcus furiosus*, *Thermococcus kodakarensis*) als auch eukaryotische (*Pichia pastoris*, Sf9) Systeme herangezogen. Um ein breites Spektrum unterschiedlicher Proteine für die heterologe Expression abzudecken, sollten außerdem nicht nur MFS Transporter, sondern auch eine Reihe anderer Membranproteine von *I. hospitalis* untersucht werden. Zur Identifizierung geeigneter Kandidaten wurden bioinformatische Analysen angestellt, um einen umfangreichen Datensatz vorhergesagter Membranproteine von *I. hospitalis* zu erhalten.

Da *N. equitans* wohl energetisch und metabolisch von *I. hospitalis* abhängt und dieser zudem der einzige bekannte Wirt für *N. equitans* ist, sollte nach Möglichkeit auch die Frage nach Transportvorgängen zwischen den beiden Organismen geklärt werden. Um das Zusammenspiel der Cokultur besser zu verstehen, sollten außerdem Transporter von *N. equitans* selbst untersucht werden. Da das Genom nur zehn annotierte Transporter enthält, wurde das als C₄-Dicarboxylat Transporter hinterlegte Protein Neq014 ausgewählt. Auch für Membranproteine von *N. equitans* sollte zunächst ein heterologes Expressionssystem etabliert werden.

Im Zuge einer weiteren Charakterisierung sollte nach erfolgreicher Expression eines Membranproteins von *I. hospitalis* und/oder *N. equitans* im nächsten Schritt die Reinigung und Kristallisation erfolgen.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Substanzen und Materialien

2.1.1 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat (BCIP)	Gerbu, Wieblingen
Acetonitril	J. T. Baker, Deventer (NL)
Acrylamid 30 % (Rotiphorese Gel 30)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Adenosin 5'-triphosphat Magnesiumsalz	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Agarose NEEO, Ultra-Qualität (Rotigarose)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Albumin Fraction V (BSA), Protease-frei	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ammoniumhydrogencarbonat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ampicillin	AppliChem GmbH, Darmstadt
Bacto Hefeextrakt	BD, Sparks (US)
Bacto Trypton	BD, Sparks (US)
Biotin	Sigma Aldrich GmbH, Taufkirchen
β -Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Bromphenolblau Natriumsalz	AppliChem GmbH, Darmstadt
Carbenicillin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Chloramphenicol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Coomassie Brilliant Blue R250/G250	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
DMSO	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
ϵ -Aminocaprinsäure	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Ethanol, absolut	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
Ethidiumbromid	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Fetal Bovine Serum (FBS)	Life Technologies (Invitrogen), Carlsbad (US)
Glycerin, 86 %	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Glycin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
H ₂ O, Nuklease-frei	QIAGEN, Hilden
Imidazol, ACS Reagenz	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Kanamycin	AppliChem GmbH, Darmstadt
Low Gelling Temperature Agarose	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Neutralrot	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT)	Gerbu, Wieblingen
Pefabloc® SC	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
Penicillin Streptomycin (PenStrep)	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
PIPES	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Pluronic® F-68	Sigma Aldrich GmbH, Taufkirchen
Polyethylenglykol (PEG) 400	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ponceau S	Serva Feinbiochemica GmbH, Heidelberg

Resazurin	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Simvastatin	Hexal, Holzkirchen
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Tricin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Tween20	Sigma Aldrich GmbH, Taufkirchen
Yeast Nitrogen Base	Sigma Aldrich GmbH, Taufkirchen

Alle weiteren hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden von der Firma VWR Darmstadt bezogen. Sofern nicht anders angegeben, betrug der Reinheitsgrad aller Substanzen p.a. (zur Analyse).

2.1.2 Detergenzien

Detergenz	Detergenzklasse	Hersteller
Cymal 5 , Neopentyl Glycol (2,2-bis(3'-Cyclohexylpropyl) Propan-1,3-bis- β -D-Maltopyranosid)	nichtionisch, Maltosid	Anatrace Inc., Maumee (US)
Cymal 6 , Anagrade (6-Cyclohexyl-1-Hexyl- β -D-Maltosid)	nichtionisch, Maltosid	Anatrace Inc., Maumee (US)
DDM , > 99% highly purified (n-Dodecyl β -Maltosid)	nichtionisch, Maltosid	GLYCON Biochemicals GmbH, Luckenwalde
DM , Anagrade (n-Decyl- β -D-Maltopyranosid)	nichtionisch, Maltosid	Anatrace Inc., Maumee (US)
Fos-Choline-12 , Anagrade (n-Dodecylphosphocholin)	zwitterionisch, Lipid-ähnlich	Anatrace Inc., Maumee (US)
Fos-Choline-14 , Anagrade (n-Tetradecylphosphocholin)	zwitterionisch, Lipid-ähnlich	Anatrace Inc., Maumee (US)
LDAO , Anagrade (n-Dodecyl-N,N-Dimethylamin-N-Oxid bzw. Lauryldimethylamine-N-Oxid)	zwitterionisch, Aminoxid	Anatrace Inc., Maumee (US)
LMNG (2,2-Didecylpropan-1,3-bis- β -D-Maltopyranosid bzw. Lauryl Maltose Neopentyl Glycol)	nichtionisch, Glykosid	Anatrace Inc., Maumee (US)
NG , Sol-Grade (n-Nonyl- β -D-Glucopyranosid)	nichtionisch, Glykosid	Anatrace Inc., Maumee (US)
OG , Anagrade (n-Octyl- β -D-Glucopyranosid)	nichtionisch, Glykosid	Anatrace Inc., Maumee (US)
Triton X-100 , laboratory grade (Polyethylenglycol p-(1,1,3,3-Tetramethylbutyl)-Phenylether)	nichtionisch, Octylphenoethoxylat	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
UDM , > 99% highly purified (n-Undecyl- β -Maltosid)	nichtionisch, Maltosid	GLYCON Biochemicals GmbH, Luckenwalde

2.1.3 Enzyme

Enzym	Hersteller
Alkaline Phosphatase, Calf Intestinal (CIP)	New England Biolabs GmbH, Frankfurt (Main)
DNase I	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Phire Hot Start II Polymerase	New England Biolabs GmbH, Frankfurt (Main)
Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (2000 U/ml)	New England Biolabs GmbH, Frankfurt (Main)
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs GmbH, Frankfurt (Main)
T4 DNA Ligase (400.000 Units/ml)	New England Biolabs GmbH, Frankfurt (Main)
Trypsin Sequencing Grade	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

2.1.4 Molekulare Massenstandards

Massenstandard	Hersteller
GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder (75–20000 bp)	Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford (US)
High Molecular Weight Calibration Kit for Native Electrophoresis (66–669 kDa)	GE Healthcare, Little Chalfont (UK)
PageRuler Prestained Protein Ladder (10–170 kDa)	Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford (US)

2.1.5 Reaktionskits und Screens

Kit/Screen	Hersteller
BCA Protein Assay Kit Pierce™	Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford (US)
Bradford-Reagenz	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Dynabeads® His-Tag Isolation & Pulldown	Life Technologies (Novex), Carlsbad (US)
EasySelect™ <i>Pichia</i> Expression Kit	Life Technologies (Invitrogen), Carlsbad (US)
flashBAC™ 5 reaction Kit	Oxford Expression Technologies, Oxford (GB)
innuPREP Plasmid Mini Kit	Analytik Jena AG, Jena
MemGold™ HT-96	Molecular Dimensions, Cambridge (GB)
Multi-Copy <i>Pichia</i> Expression Kit	Life Technologies (Invitrogen), Carlsbad (US)
QIAprep Spin Miniprep Kit	QIAGEN, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN, Hilden
QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit	Agilent Technologies Inc., Santa Clara (US)
ReliaPrep™ gDNA Tissue Miniprep System	Promega, Mannheim

2.1.6 Antikörper

2.1.6.1 Primäre Antikörper

Spezifität	Spezies	Hersteller
Anti-His (C-Term), monoklonal	Maus	Life Technologies (Invitrogen), Carlsbad (US)
Anti-His (poly-His), monoklonal	Maus	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Anti Neq014	Kaninchen	Davids Biotechnologie, Regensburg
Anti Iho0391	Kaninchen	Davids Biotechnologie, Regensburg

2.1.6.2 Sekundäre Antikörper

Spezifität	Spezies	Hersteller
Anti-Mouse IgG (whole molecule)- Alkaline Phosphatase	Kaninchen	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Anti-Rabbit IgG + DyLight 650	Ziege	Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford (US)

2.1.7 Säulen und Säulenmaterial

Säulen/-material	Hersteller
HiTrap™ Chelating HP (5 ml)	GE Healthcare, Little Chalfont (UK)
illustra™ NAP-5 /NAP-10	GE Healthcare, Little Chalfont (UK)
PD-10 Desalting Column	GE Healthcare, Little Chalfont (UK)
Superose 6 10/300 GL (24 ml)	GE Healthcare, Little Chalfont (UK)
Ni-NTA Agarose	QIAGEN, Hilden
TALON® Metal Affinity Resin	Clontech Laboratories Inc., Mountain View (US)

2.1.8 Sonstige Materialien

Material	Hersteller
24-/96-well Kristallisationsplatten	Hampton Research, Aliso Viejo (US)
96-well Platten, Costar™	Corning Life Sciences, Corning (US)
96-well Platten (schwarz)	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim
Amicon Ultra Centrifugal Filters	Merck KGaA, Darmstadt
Anaerobentöpfe	Mechanikwerkstatt Biologie, Universität Regensburg
Immun-Blot® PVDF Membran (0,2 µm)	Biorad Laboratories Inc., Hercules (US)
Kupfernetzchen (G 2200C: 200 Square Mesh)	Plano, Wetzlar
Membranfilter, Cellulosemischester (Ø 0,22 µm)	Whatman GmbH, Dassel
Spin X® Centrifuge Tube Filter (Ø 0,22 µm), Costar™	Corning Life Sciences, Corning (US)
Sterilfilter (Ø 0,22 µm)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
VivaSpin™-Zentrifugenröhrchen	Sartorius AG, Göttingen
Zellkulturflaschen T25 / T75 / T175	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Zellkulturschalen 35 mm²	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht

2.1.9 Geräte

Gerät	Hersteller
Agarose-Gelelektrophorese Kammern	Mechanikwerkstatt Biologie, Universität Regensburg
ÄKTA Chromatographiesystem (ÄKTA purifier, ÄKTA pure)	GE Healthcare, Little Chalfont (UK)
Autoklav SANoclav	Wolf, Geislingen
Sterilbank	
- Bioair Safeflow 1.2	EuroClone S.p.A., Pero (IT)
- Flow Laboratories BSB4A	Gelaire, Sydney (AU)
BioDoc-It Imaging System	Ultra-Violet Products Ltd (UVP), Upland (US)

FastPrep®-24	M. P. Biomedicals, Irvine (US)
Fermenter 15 l	BiOENgINEERiNG, Wald (CH)
Fluoreszenzspektrometer (Cary Eclipse)	Varian Medical Systems, Inc., Palo Alto (US)
Fujifilm FLA-5000 Scanner	Fujifilm, Düsseldorf
Gefriertrocknungsanlage Lyophylle Beta 1-16	Christ, Osterode
Gradientenmischer	Mechanikwerkstatt Biologie, Universität Regensburg
Hochdruckzellaufschluss-System Modell TS 0.75 (Cell Disruptor)	Constant Systems Ltd., Daventry (GB)
Inkubationsschüttler (Multitron Standard, Multitron Pro)	Infors AG, Bottmingen (CH)
INCU-Line® Inkubator	VWR, Darmstadt
Kamera Canon EOS 1000 D	Canon Inc., Tokyo (JP)
Kühler RC-10 Digital Chiller	VWR, Darmstadt
MALDI-TOF MS/MS-Analyzer (4700 Proteomics)	Applied Biosystems, Forster City (US)
Mikroskope	
- Leica MDG41	Leica, Wetzlar
- Nikon Eclipse TS100	Nikon, Düsseldorf
- Olympus BX60	Olympus, Hamburg
Mini-Protean Tetra System	Biorad Laboratories inc., Hercules (US)
Mosquito Pipetting Robot	TTP Labtech, Melbourn (UK)
Nanodrop Spectrophotometer ND-1000	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
PCR Thermal Cycler Doppio	VWR, Darmstadt
pH-Meter inoLab pH 7110	WTW, Weilheim
Photometer	
- GENESYS 10S UV-Vis Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford (US)
- Ultrospec 10 Cell Density Meter	GE Healthcare, Uppsala (SE)
TECAN Infinite M200 Pro (Platereader)	Tecan Austria GmbH, Gröding (AT)
Überkopfschüttler RM-2L	ELMI, Riga (LV)
Wasserbad Haake L Fisons	Haake, Karlsruhe
White/UV Transilluminator	Ultra-Violet Products Ltd (UVP), Upland (US)
Zählkammern (Neubauer, Thoma)	LO - Laboroptik Ltd, Lancing (UK)
Zentrifugen	
- Allegra X-15R	Beckmann Coulter, Palo Alto (US)
- Avanti J-26-XP	Beckmann Coulter, Palo Alto (US)
- Contifuge Stratos	Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford (US)
- Eppendorf 5430 R	Eppendorf, Hamburg
- Heraeus Biofuge Fresco	Kendro Laboratory Products, Osterode
- Heraeus Labofuge 400R	Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford (US)
- Microcentrifuge MC-13	Kendro Laboratory Products, Osterode
- Optima Max-XP Ultracentrifuge	Beckmann Coulter, Palo Alto (US)
- Optima XPN-100 Ultracentrifuge	Beckmann Coulter, Palo Alto (US)

2.2 Sterilisation

Hitzestabile Medien sowie Zusätze wurden für 20 min bei 121 °C (2 bar) im Autoklaven sterilisiert. Alle anderen hier aufgeführten Medien, Zusätze, Puffer und Lösungen wurden über einen bakteriendichten, sterilen Filter (Porenweite 0,2 µm) keimfrei gemacht. Zentrifugenbecher, Spatel und Verbrauchsmaterialien wurden 40 min bei 121 °C (2 bar) autoklaviert. Anschließend wurden die Materialien im Trockenschrank bei 60 °C getrocknet. Glaswaren wie Erlenmeyerkolben wurden über Nacht bei 140 °C trocken sterilisiert.

2.3 Medien und Antibiotika

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Chemikalien in H₂O_{Millipore} gelöst und die pH-Werte der Medien mit NaOH- oder HCl-Lösung eingestellt.

2.3.1 Medien für die *E. coli* Expression

2.3.1.1 SOC-Medium (Hanahan, 1983)

SOC-Medium (Super Optimal Broth with Catabolite Repression), pH 7,0	
Bacto Trypton	2 % (w/v)
Bacto Hefeextrakt	0,5 % (w/v)
NaCl	0,05 % (w/v)
KCl	2,5 mM
MgCl ₂	10 mM
MgSO ₄	10 mM
Glukose	20 mM

Von KCl, MgCl₂ und Glukose wurden separat 1 M Stammlösungen hergestellt und erst nach dem Autoklavieren steril zugegeben.

2.3.1.2 LB-Medium (Bertani, 1951)

LB-Medium (Lysogeny Broth), pH 7,0	
Bacto Trypton	1 % (w/v)
Bacto Hefeextrakt	0,5 % (w/v)
NaCl	1 % (w/v)

Für die Herstellung von LB-Agarplatten wurde dem Medium zusätzlich 1,5 % (w/v) Agar hinzugefügt.

2.3.1.3 2YT Medium

2YT-Medium, pH 7,0	
Bacto Trypton	1,6 % (w/v)
Bacto Hefeextrakt	1 % (w/v)
NaCl	0,5 % (w/v)

2.3.2 Medien für die *P. furiosus* Expression

Synthetisches Meerwasser (SME Stammlösung), (Stetter <i>et al.</i> , 1983)	
NaCl	27,7 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	7,0 g
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	5,5 g
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,75 g
KCl	0,65 g
NaBr	0,10 g
H ₃ BO ₃	0,03 g
SrCl ₂ x 6 H ₂ O	0,015 g
KJ-Lösung (0,1 %)	0,1 ml
H ₂ O _{Millipore}	ad 1000 ml

½ SME-Medium, pH 7,0 (Blöchl <i>et al.</i> , 1997)	
SME Stammlösung	500 ml
KH ₂ PO ₄	0,5 g
NH ₄ Cl	0,5 g
Wolfes Mineralien (10x), pH 1,0, ohne Titriplex	0,1 ml
Resazurin 0,2 %	0,5 ml
Na ₂ S x 3 H ₂ O	0,3 g
H ₂ O _{Millipore}	ad 1000 ml

P. furiosus Zellen wurden in ½ SME-Medium, basierend auf dem originalen SME-Medium (Fiala und Stetter, 1983), mit verschiedenen organischen Substraten anaerob kultiviert. Das ½ SME-Stärke-Medium enthielt zusätzlich je 0,1 % (w/v) Stärke, Hefeextrakt und Pepton. Für die Herstellung von ½ SME-Pyruvat-Medium wurde die Stärke durch 40 mM Natriumpyruvat ersetzt. Um feste Nährmedium zu erhalten wurde je 1 % (w/v) Gelrite zugegeben.

2.3.3 Medien für die *P. pastoris* Expression

YPD-Medium (Yeast Extract Peptone Dextrose)		MD-Medium (Minimal Dextrose)	
Bacto Hefeextrakt	1 % (w/v)	Yeast Nitrogen Base (YNB)	1,34 % (w/v)
Pepton	2 % (w/v)	Dextrose	20 % (w/v)
Glukose	2 % (w/v)	Biotin	4 x 10 ⁻⁵ % (w/v)

MGY-Medium (Minimal Glycerol)		MM-Medium (Minimal Methanol)	
YNB	1,34 % (w/v)	YNB	1,34 % (w/v)
Glycerin	1 % (w/v)	Methanol	1 % (w/v)
Biotin	4 x 10 ⁻⁵ % (w/v)	Biotin	4 x 10 ⁻⁵ % (w/v)

Die Medienzusätze YNB, Biotin und Glukose wurden sterilfiltriert und erst nach dem Autoklavieren zugegeben. Für die Herstellung von Agarplatten wurde dem jeweiligen Medium 1,5 % (w/v) Agar hinzugefügt.

Für einige Experimente wurde auch gepuffertes MGY-Medium (BMG) oder gepuffertes MM-Medium (BMM) verwendet. Diese Medien enthielten zusätzlich 100 mM Kaliumphosphat Puffer pH 6,0.

Des Weiteren wurden vereinzelt Expressionen in komplexem BMG- oder BMM-Medium durchgeführt. Um diese Vollmedien herzustellen wurden Hefeextrakt (1 %, w/v) sowie Pepton (2 %, w/v) zugegeben. Die Medien sind im Folgenden als BMGY und als BMMY Medium abgekürzt.

2.3.4 Medien für die Zellkultur (Sf9-Zellen)

Für die Kultivierung der Sf9 Insektenzellen wurde das Insect-XPRESS™ Protein-free Insect Cell Medium mit L-Glutamin (Lonza, Basel, CH) verwendet. Je nach Versuch wurde dem Medium zusätzlich 5–10 % (v/v) FBS und gegebenenfalls Antibiotikum (PenStrep) zugegeben. Außerdem wurde das Medium vor Verwendung immer im Wasserbad auf 27 °C vorgewärmt.

2.3.5 Antibiotika

Stammlösung	Arbeitskonzentration	
Ampicillin	100 mg/ml	100 µg/ml
Carbenicillin	100 mg/ml	100 µg/ml
Chloramphenicol in EtOH p.A.	34 mg/ml	34 µg/ml
Kanamycin	50 mg/ml	50 µg/ml
Penicillin Streptomycin (PenStrep)	10 mg/ml	10 µg/ml
Simvastatin in EtOH p.A.	1 mM	10 µM

2.4 Verwendete Organismen

2.4.1 Bakterielle Zellstämme

In dieser Arbeit wurden Bakterienstämme der Spezies *E. coli* verwendet. Alle bakteriellen Zellstämme wurden als chemisch kompetente Zellen vom Hersteller bezogen oder wurden nach Protokoll (CaCl₂-Methode, siehe 2.8.6) selbst chemisch kompetent gemacht.

2.4.1.1 Klonierungszellstämme

Zellstamm	Genotyp	Referenz
DH5α	F ⁻ Φ80/ <i>lacZ</i> ΔM15 Δ(<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>recA1 endA1</i> <i>hsdR17</i> (rK ⁻ , mK ⁺) <i>phoA supE44</i> λ ⁻ <i>thi-1 gyrA96 relA1</i>	Life Technologies, Carlsbad (US)
TOP10	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ80/ <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74</i> <i>recA1 araD139</i> Δ(<i>araIeu</i>)7697 <i>galU galK rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1</i> <i>nupG</i>	Life Technologies, Carlsbad (US)

2.4.1.2 Expressionszellstämme

Zellstamm	Genotyp	Referenz
BL21 (DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B</i> (r _B ⁻ , m _B ⁻) <i>gal dcm</i> (DE3)	Life Technologies, Carlsbad (US)
BL21(DE3) pLysS	F ⁻ <i>ompT hsdS_B</i> (r _B ⁻ , m _B ⁻) <i>gal dcm</i> (DE3) pLysS (Cam ^R)	Life Technologies, Carlsbad (US)
BL21 Star™ (DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B</i> (r _B ⁻ , m _B ⁻) <i>gal dcm rne131</i> (DE3)	Life Technologies, Carlsbad (US)
C41 (DE3)	F ⁻ <i>ompT gal dcm hsdS_B</i> (r _B ⁻ m _B ⁻)(DE3)	Lucigen Corp., Middleton (US)
C43 (DE3) ΔAcrB	F ⁻ <i>ompT gal dcm hsdS_B</i> (r _B ⁻ m _B ⁻)(DE3) ΔAcrB	Dr. Özkan Yildiz, MPI Frankfurt
NM554	<i>recA13 araD139</i> Δ(<i>ara-leu</i>)7696 Δ(<i>lac</i>) l7A <i>galU galK</i> <i>hsdR rpsL</i> (Str ^r) <i>mcrA mcrB</i>	Agilent Technologies, Santa Clara (US)
Rosetta™ 2 (DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal dcm</i> (DE3) pRARE2 (Cam ^R)	Merck KGaA, Darmstadt

Die Expressionszellstämme BL21 Star™ (DE3), C41 (DE3), C43 (DE3), BL21(DE3) pLysS und Rosetta™ 2 (DE3) sind Derivate des *E. coli* Stammes BL21 (DE3). Die Bezeichnung DE3 gibt an, dass der jeweilige Stamm ein λ(DE3)-Lysogen enthält, welches unter Kontrolle des *lacUV5*-Promotors die cDNA der T7-RNA-Polymerase trägt. Die Stämme eignen sich daher besonders für den Einsatz eines IPTG-induzierbaren pET-Expressionssystems. Auf Grund der verbesserten Stabilität seiner mRNA weist der Stamm BL21 Star™, verglichen zu BL21, eine höhere basale Expressionsrate auf. Die Stämme C41 und C43 weisen mindestens eine nicht charakterisierte Mutation auf, welche den Zelltod, der in Verbindung mit der Expression von vielen rekombinanten, toxischen Proteinen einhergeht, verhindert. Daher werden auch bevorzugt Membranproteine in den beiden Stämmen exprimiert. Das Plasmid von BL21(DE3) pLysS produziert ein T7 Lysozym, welches die basale Expressionrate reduziert. Dies ist besonders für die Expression von toxischen Genen von Vorteil. Durch Bereitstellung entsprechender tRNAs verbessert der Rosetta™ 2 Stamm die Expression von Genen, welche durch die seltenen Codons AGA, AGG, AUA, CUA, GGA, CCC und CGG verschlüsselt werden. Gene, welche Methylcytosine enthalten, können besonders effizient in NM554 exprimiert werden, da der Stamm keine restriktive Wirkung auf methylierte Nukleotide aufweist.

2.4.2 Archaeelle Organismen

Zellstamm	Herkunft	Referenz
<i>Ignicoccus hospitalis</i> KIN/4I	Kolbeinsey Rücken, Island	Paper <i>et al.</i> , 2007
<i>Nanoarchaeum equitans</i> Kin4/M	Kolbeinsey Rücken, Island	Huber <i>et al.</i> , 2002
<i>Pyrococcus furiosus</i> Vc1	Vulcano, Italien	Fiala und Stetter, 1986

2.4.3 Eukaryotische Zellstämme

Zellstamm	Genotyp	Referenz
<i>Pichia pastoris</i> SMD1163	<i>his4, pep4, prb1</i>	Life Technologies, Carlsbad (US)
Sf9 (ATCC® CRL-1711™)	Zelllinie aus Ovar-Zellen von <i>Spodoptera frugiperda</i>	ATCC, Rockville (US)

2.5 Mikroskopie

2.5.1 Lichtmikroskopie

Das Wachstum der verschiedenen Kulturen (*E. coli*, *P. furiosus*, *P. pastoris*) wurde lichtmikroskopisch mit dem Phasenkontrastmikroskop Olympus BX60 überprüft. Dazu standen ein Luftobjektiv mit 40-facher, sowie ein Ölimmersionsobjektiv mit 100-facher Vergrößerung zur Verfügung. Da das Mikroskop zusätzlich über eine Auflichtfluoreszenzeinrichtung mit Quecksilberhöchstdruckdampflampe verfügt, konnte es auch für die Fluoreszenzmikroskopie verwendet werden. Daher war es möglich, DAPI gefärbte Präparate (fluoreszente Markierung von Nukleinsäuren) zu betrachten. Das Wachstum der Sf9-Zellen wurde mit einem inversen Mikroskop (Nikon Eclipse TS100) und Luftobjektiven mit 40-, 20- und 10-facher Vergrößerung kontrolliert.

2.5.2 Transmissionselektronenmikroskopie

Die Aufnahme von elektronenmikroskopischen Bildern erfolgte durch Veronika Heinz und Prof. Dr. Reinhard Rachel (Zentrum für Elektronenmikroskopie, Universität Regensburg) an einem Philips CM12 Transmissionselektronenmikroskop (FEI, Eindhoven, NL) mit LaB6-Kathode und einer digitalen Slow-Scan-CCD-Kamera (TEM-1000; TVIPS, Gauting), sowie an einem JEOL JM-2100F (JEOL Ltd., Tokyo, JP) mit Feldemissionskathode und 4k x 4k CMOS Kamera (TemCam-F416;TVIPS, Gauting).

Gereinigte Proteinproben wurden zur Qualitätsüberprüfung negativkontrastiert und ebenfalls mittels TEM kontrolliert. Dafür wurden je 3 µl Probe auf ein kohlebeschichtetes Kupfernetzchen (Grid) aufgebracht und darauf für 1 min inkubiert. Die Kontrastierung erfolgte für 30 sek mit 3 µl Uranylacetatlösung (2 %, w/v). Die trockenen Grids wurden bis zu ihrer Verwendung in Gridboxen gelagert.

Die Immunmarkierung von Ultradünnschnitten wurde freundlicherweise ebenfalls von Veronika Heinz durchgeführt. Die untersuchten Zellen wurden wie bereits beschrieben (Junglas *et al.*, 2008; Rachel *et al.*, 2010) präpariert und analysiert.

2.6 Plasmide

Plasmid	Resistenz	Eigenschaften	Referenz
pBAD	Amp ^R	<i>E. coli</i> Expression, <i>araB</i> -Promotor, His6 N-Term	Life Technologies, Carlsbad (US)
pET-26b(+)	Kan ^R	<i>E. coli</i> Expression, T7-Promotor, His6 C-Term	Merck Chemicals GmbH, Schwalbach
pET-28a(+)_MISTIC	Kan ^R	<i>E. coli</i> Expression, T7-Promotor, His6 N-Term, Mistic N-Term, Prsc-Site	Dr. Özkan Yildiz, MPI Frankfurt
pPIC3.5k	Amp ^R , G418	<i>P. pastoris</i> Expression, AOX1-Promotor	Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford (US)
pTTQ18-A2	Amp ^R	<i>E. coli</i> Expression, <i>tac</i> -Promotor, His10 C-Term	Dr. Kristian Parey, MPI Frankfurt
pTTQ18_GFP	Amp ^R	<i>E. coli</i> Expression, <i>tac</i> -Promotor, His10 C-Term, GFP C-Term, Prsc-Site	Dr. Ekaitz Errasti-Murugarren, IRB Barcelona
pVL1393	Amp ^R	Transfervektor für Sf9 Expression, Polyhedrin-Promotor	Life Technologies, Carlsbad (US)
pYS3	Sim ^R	<i>P. furiosus</i> Shuttle-Vektor, <i>gdh</i> -Promotor	Waage <i>et al.</i> , 2010

Die meisten der hier verwendeten Plasmide sind Standardvektoren für die Expression in *E. coli* (pET, pBAD, pTTQ) bzw. *P. pastoris* (pPIC) oder Sf9 Insektenzellen (pVL1393).

Der pET-28a(+)_MISTIC Vektor enthält N-terminal die Sequenz des sogenannten Mistic-Proteins. Mistic (Membrane-integrating Sequence for Translation of Integral Membrane Protein Constructs) ist ein ungewöhnliches integrales Membranprotein von *B. subtilis*, welches sich autonom in die Membran einbaut und dabei vorhandene zelluläre Translokationssysteme umgeht (Roosild *et al.*, 2005). pTTQ18_GFP enthält C-terminal einen zusätzlichen Green Fluorescent Protein (GFP)-Tag. Sowohl Mistic- als auch GFP-Tag lassen sich über eine eingefügte Protease Schnittstelle (Prsc-Site) entfernen. pYS3 ist ein spezieller Transfervektor, welcher sowohl für die Klonierung in *E. coli* als auch für die spätere Expression in *P. furiosus* genutzt werden kann.

2.7 Oligonukleotide

Primer	Plasmid	Sequenz (5' → 3')
T7 forward	pET-26b(+)	TAATACGACTCACTATAGGG
T7 reverse (T7 Terminator)	pET-26b(+)	GCTAGTTATTGCTCAGCGG
pBAD forward	pBAD	ATGCCATAGCATTTTATCC
pBAD reverse	pBAD	GATTTAATCTGTATCAGG
Polyhedrin forward	pVL1393	AAATGATAACCATCTCGC
Polyhedrin reverse	pVL1393	GTCCAAGTTTCCCTG
Primer für Klonierung von Membranproteinen von <i>I. hospitalis</i>		
CLC_forward_NdeI	pET-26b(+)	CGCCATATGATGAAGGTTAATGACCTCCC
CLC_forward_NdeI_halbeSQ	pET-26b(+)	CGTCATATGATGGAGGACCTACAAGCGC
CLC_reverse_XhoI	pET-26b(+)	ATCGACTCGAGCTAGGTGCCCTTAACCTCC
CLC_forward_XhoI	pBAD	CGTCTCGAGAAGGTTAATGACCTCCCAGAG
CLC_forward_XhoI_halbeSQ	pBAD	CGTCTCGAGGAGGACCTACAAGCGCTC
CLC_reverse_HindIII	pBAD	TTCAAGCTTCTAGGTGCCCTTAACCTCC
Prom0613_for	pYS3	CTATTAGATATCTCCTTAACATTTCTCCAAAA
Prom0613_rev_fus_CTer	pYS3	GGGAGGTCATTAACCTTCATTTTTTACCTCCAGAATTTTA
Igni_CLC_for_CTer	pYS3	ATGAAGGTTAATGACCTCCC
Igni_CLC_rev_CTer	pYS3	TCAGTGATGGTGATGGTGATGGTGATGGTGATGGGTGCCCTTAACTTCCTC
Term1831_for_CTer	pYS3	CATCACCATCACCATCACCATCACCATCACTGAAATCTTTTTTAGCACTTTTCTTTTTC
Term1831_rev	pYS3	TCAATTGATATCACCTAGAAAAAGATAAGC
Prom0613_rev_fus_NTer	pYS3	GCCGAGCGCTGTAGGTCCTCTGGGAGGTCATTAACCTTCATTTTTCACCTCCAGAATTTTA
Igni_CLC_for_fus_NTer	pYS3	CTACAAGCGCTCGGCCATCACCATCACCATCACCATCACGCGGCC TTCCTAATAGG
Igni_CLC_rev_Fus_NTer	pYS3	GAAAAGTGCTAAAAAAGATTTTCAGGTGCCCTTAACCTC
Term183_for_NTer	pYS3	TGAAATCTTTTTAGCACTTTTC
0394_forward_NdeI	pET-26b(+)	CGCCATATGATGGAGGCAGAAGTGATAATTTTC
0394_reverse_XhoI	pET-26b(+)	AGCTACTCGAGTCAAGGGCTGACGGCCTC
0394_forward_NdeI	pBAD	ATCGACATATGGAGGCAGAAGTGATAATTTTCG
0394_reverse_HindIII	pBAD	TGCAAGCTTTCAAGGGCTGACGGCC
0302_forward	pET-26b(+)	ATATATGCTCTTCTAGTAAAGAATTTTACGCCTTGTTGCTCGT
0302_reverse	pET-26b(+)	CCAAGTGCTCTTCATGCCTCGGCCGAACCTCGTGAGAGCGTTGA
0391_forward_EcoRI	pTTQ18_GFP	CGGAATTCATGTGGACGAAGCTGG
0391_reverse_BamHI	pTTQ18_GFP	CGGGATCCCCCTCAGCTTTAACGG
0555_forward_EcoRI	pTTQ18_GFP	CGGAATTCATGAAGGGGCTCTTGG
0555_reverse_BamHI	pTTQ18_GFP	CGGGATCCAATCCCGGCGGG
0800_forward	pET-26b(+)	ATATATGCTCTTCTAGTTTGAATACCTCTTCGGCTTAGTGAGC
0800_reverse	pET-26b(+)	TATATAGCTCTTCATGCTAATTTTGAATGAGCCTTCTCCCT
0800_forward_EcoRI	pTTQ18_GFP	CGGAATTCATGTTGAATACCTCTTCG
0800_reverse_BamHI	pTTQ18_GFP	CGGGATCCTAATTTTGAATGAGCCTTTC
1008_forward	pET-26b(+)	ATATATGCTCTTCTAGTGAAGTACTCGAGGAGCTACACCGCTT
1008_reverse	pET-26b(+)	TATATAGCTCTTCATGCTTCCCGGCTCAAACGTTTCTGCCGAC
1012_forward	pET-26b(+)	ATATATGCTCTTCTAGTAGGGAGGAAGCAGCCGCTTTCTC
1012_reverse	pET-26b(+)	ACTGACGCTCTTCATGCAGCTCCCAATTTTTTCGCTTCTTCCC

Primer für Klonierung von Tko1655 von *T. kodakarensis*

Tko1655_forward_XhoI	pBAD	CGCCTCGAG ATGGGAAACGGAGAAAAG
Tko1655_reverse_HindIII	pBAD	CCCAAGCTT TCAGCGTTCGGGG
Tko1655_forward_NdeI	pET-26b(+)	CGCCATATG ATGGGAAACGGAGAAAAG
Tko1655_reverse_XhoI	pET-26b(+)	CCGCTCGAG GCGTTCGGGGACG
BamHI_forward	pTTQ18_GFP	GA AAAAATATGGCAGCCCGGAAGGATCCGGTGGCGGTCTGGAA GTTC
BamHI_reverse	pTTQ18_GFP	GA ACTTCCAGACCGCCACCGGATCCTTCCGGGCTGCCATATTTTT TC
Tko1655_forward_EcoRI	pTTQ18_GFP	CG GAATTC ATG GGA AAC GGA GAA AAG GGT AC
Tko1655_reverse_BamHI	pTTQ18_GFP	CG GGATCC GCG TTC GGG GAC GAG CAA CAT AAG

2.8 Molekularbiologische Methoden**2.8.1 Polymerase Kettenreaktion (PCR)**

Zur Vervielfältigung von DNA Fragmenten wurde eine Polymerase-Kettenreaktion nach folgender Anleitung durchgeführt:

	Volumen	Endkonzentration
5x Phusion HF Buffer	10 µl	1x
10 mM dNTPs	1 µl	je 200 µM
Primer A (forward)	2 µl	0,5 µM
Primer B (reverse)	2 µl	0,5 µM
Template DNA	1 µl	5–10 ng
Phusion High-Fidelity DNA Polymerase	0,5 µl	0,02 U/µl
H ₂ O _{Nuklease-frei}	ad 50 µl	---

Schritt	Temperatur	Dauer	
Initialdenaturierung	98 °C	30 sek	
Denaturierung	98 °C	5 sek	} 30 x
Hybridisierung	60 °C	30 sek	
Extension	72 °C	30 sek/1 kb	
Finale Extension	72 °C	5 min	

2.8.2 Fusions-PCR

Um zwei PCR-Produkte miteinander zu fusionieren, wurde die DNA in äquimolaren Mengen eingesetzt. Für einen 50 µl Ansatz wurden je 5 ng des PCR-Produktes verwendet. Die übrigen Komponenten wurden wie oben beschrieben (siehe 2.8.1) eingesetzt.

Die Fusion erfolgte in zwei Schritten: Die ersten 3–5 Zyklen dienen zur Anlagerung der überhängenden Enden und zum Auffüllen der Stränge. Dieser Schritt wurde ohne Primer durchgeführt. Danach wurden

die jeweiligen Primer (0,5 μM) den PCR-Ansätzen hinzugefügt. Die Amplifikation des Gesamtfragments erfolgte in 30 Zyklen.

Schritt	Temperatur	Dauer	
Initialdenaturierung	98 °C	30 sek	
Denaturierung	98 °C	5 sek	} 3–5 x
Hybridisierung	58 °C	30 sek	
Extension	72 °C	30 sek/1 kb (größtes Template)	
Primer Zugabe	72 °C	2 min	
Denaturierung	98 °C	5 sek	} 30 x
Hybridisierung	60 °C	30 sek	
Extension	72 °C	30 sek/1 kb (Gesamtfragment)	
Finale Extension	72 °C	5 min	

Die erhaltenen PCR-Produkte wurden stets über präparative Agarosegele (siehe 2.8.3) aufgereinigt um schwache Nebenprodukte zu entfernen.

2.8.3 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Analyse von PCR-Produkten sowie den Produkten des Restriktionsenzymverdaus wurde eine horizontale Agarose-Gelelektrophorese angewandt. Die DNA wird dabei im elektrischen Feld gemäß ihrer Größe aufgetrennt. Hierfür wurden 1%ige (w/v) Agarose-Gele, welche mit 0,01 % Ethidiumbromid (v/v) versetzt wurden, verwendet. Die DNA-Proben wurden mit 6x Loading Dye (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, US) versetzt und zusammen mit einem DNA-Größenstandard (GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder“, 75–20000 bp) auf das Gel aufgetragen. Der Lauf erfolgte in 1x TAE-Puffer bei 120 V für 25 min. Die Dokumentation erfolgte mittels einer Geldokumentationsanlage.

50x TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA-Puffer) pH 8,0 (HCl)	
Tris	2 M
Eisessig	2 M
Na ₂ EDTA	50 mM

Die präparative Gelelektrophorese wurde mit 0,8%igen (w/v) Agarose-Gelen durchgeführt. Die jeweiligen DNA-Banden wurden mit einem Skalpell auf einem UV-Tisch aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem QIAquick Gel Extraction Kit nach Herstellerangaben aufgereinigt.

2.8.4 Restriktionsenzymverdau

Um Plasmid- und Insert-DNA zu linearisieren und für die Ligation vorzubereiten wurde ein Restriktionsenzymverdau durchgeführt. Die jeweiligen Reaktionsbedingungen für die verwendeten Restriktionsendonukleasen wurden mit Hilfe des „Double Digest Finder“ (New England Biolabs GmbH) ermittelt. Um eine Rezirkularisation zu verhindern wurde bei einem Restriktionsverdau von Plasmid-DNA zusätzlich Phosphatase (CIP) hinzu pipettiert.

Für einen präparativen Verdau in einem Gesamtvolumen von 20 µl wurden zwischen 2–4 µg DNA eingesetzt. Der Verdau erfolgte bei 37 °C für mindestens 2 h. Die Proben wurden anschließend in einer präparativen Gelelektrophorese ihrer Größe nach aufgetrennt und aufbereitet (siehe 2.8.3).

	Volumen
Cut Smart Buffer 10x	5 µl
Restriktionsenzym 1	2 µl
Restriktionsenzym 2	2 µl
DNA	x µl
(CIP	2,5 µl)
H ₂ O _{Nuklease-frei}	ad 50 µl

2.8.5 Ligation

Ligationen von verdauter Plasmid-DNA sowie verdauter Insert-DNA wurden mit der T4 DNA-Ligase in einem Gesamtvolumen von 20 µl und mit einem molaren Plasmid-Insert-Verhältnis von 1:1 bis 1:3 durchgeführt. Die Plasmid-Endkonzentration wurde auf 50–100 ng eingestellt.

	Volumen
Plasmid-DNA	x µl
Insert-DNA	x µl
T4 DNA Ligase Buffer 10x	2 µl
T4 DNA Ligase	1,5 µl
H ₂ O _{Nuklease-frei}	ad 20 µl

Die Ligation erfolgte über Nacht (16–18 h) bei 16 °C. Abschließend wurde die T4 DNA Ligase bei 65 °C für 10 min hitzeinaktiviert. Das Ligationsprodukt wurde in *E. coli* TOP 10 oder DH5α transformiert (siehe 2.8.7).

2.8.6 Herstellung chemisch kompetenter Zellen

Um freie DNA in *E. coli* einzubringen (mittels Transformation) müssen die Zellen zunächst chemisch behandelt werden. In dieser Arbeit wurde dafür die CaCl₂-Methode (Mandel und Higa, 1970)

verwendet. Durch einen Überschuss an Calcium-Ionen verändert sich die Durchlässigkeit der Membran und die Aufnahmefähigkeit der Zellen für freie DNA (Kompetenz) wird gesteigert.

2.8.6.1 Transformationspuffer

Zur Herstellung des Transformationspuffer wurde PIPES in $\text{H}_2\text{O}_{\text{Millipore}}$ gelöst und der pH-Wert mit KOH auf 6,7 eingestellt. Danach wurden die Salze in der hier angegebenen Reihenfolge zugegeben und dazwischen immer vollständig gelöst. Der pH-Wert wurde abschließend noch einmal kontrolliert.

Transformationspuffer (Inoue <i>et al.</i>, 1990)	
pH 6,7 (KOH)	
KCl	250 mM
$\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$	15 mM
$\text{MnCl}_2 \times 4 \text{ H}_2\text{O}$	55 mM
PIPES	10 mM

2.8.6.2 Durchführung

Um chemisch kompetente Zellen zu erhalten wurde der jeweilige *E. coli* Stamm auf einer LB-Platte ausgestrichen. Eine Einzelkolonie wurde in 20 ml LB-Medium, welches zusätzlich MgCl_2 in einer Endkonzentration von 10 mM enthielt, überführt. Die Inkubation erfolgte üN bei 37 °C unter Schütteln bei circa 80–100 rpm.

Von dieser Vorkultur wurden 1 ml bzw. 2 ml steril entnommen, um damit je 250 ml SOB-Medium (SOC-Medium ohne Glukose) anzupfen. Die Ansätze wurden bei 20 °C und 150 rpm inkubiert. Bei dieser Temperatur liegt die Verdopplungszeit bei etwa 3–4 h. Sobald die Bakterienkultur eine OD_{600} von 0,5–0,6 erreicht hatte, wurde sie für 10 min in einem Eis-Wasserbad gekühlt und anschließend bei 2500 g für 10 min bei 4 °C abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde durch leichtes Schütteln in 80 ml eiskaltem Transformationspuffer resuspendiert, erneut zentrifugiert und anschließend in 20 ml eiskalten Transformationspuffer aufgenommen. Nach Zugabe von 1,5 ml DMSO wurden die Zellen nochmals 10 Min auf Eis inkubiert. Die chemisch kompetenten *E. coli* Zellen wurden in Portionen zu je 200 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

2.8.7 Transformation von *E. coli*

Die Transformation chemisch kompetenter *E. coli* Zellen erfolgte mittels Hitzeschock. Dazu wurden je 100 µl der Zellen auf Eis aufgetaut und die DNA (Plasmid-DNA: 1 pg–100 ng; Ligationsansatz: 5µl) zugegeben. Der Transformationsansatz wurde zunächst für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Hitzeschock für exakt 45 sek bei 42 °C im Wasserbad durchgeführt. Eine 5-minütige Inkubation auf Eis folgte. Nach Zugabe von 800 µl vorgewärmtem SOC-Medium wurden die Zellen für 1 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Nach Zentrifugation (Microcentrifuge MC-13, Rotor 3324,

13000 rpm, 3 min) wurde das Zellpellet in 100 µl Medium resuspendiert und auf selektive LB-Platten ausplattiert. Die Inkubation erfolgte üN bei 37 °C.

2.8.8 Kolonie-PCR

Zur Überprüfung des Klonierungserfolges wurden von den transformierten *E. coli* Zellen Kolonie-PCRs durchgeführt. Dafür wurde unter sterilen Bedingungen Zellmaterial von den auf LB-Platten gewachsenen Klonen entnommen und in je 20 µl des Kolonie-PCR-Ansatzes resuspendiert.

	Volumen	Endkonzentration
5x Phire Reaction Buffer	4 µl	1x
10 mM dNTPs	0,4 µl	je 200 µM
Primer A (forward)	1 µl	0,5 µM
Primer B (reverse)	1 µl	0,5 µM
Phire Hot Start II DNA Polymerase	0,4 µl	---
H ₂ O _{Nuklease-frei}	ad 20 µl	---

Schritt	Temperatur	Dauer
Initialdenaturierung	98 °C	2 min
Denaturierung	98 °C	5 sek
Hybridisierung	60 °C	10 sek
Extension	72 °C	30 sek
Finale Extension	72 °C	2 min

30 x

Von Klonen mit positivem Ergebnis nach der Kolonie-PCR wurde eine Plasmidpräparation mit anschließender DNA-Sequenzierung durchgeführt.

2.8.9 Isolierung von Plasmid-DNA und Sequenzierung

Die Plasmid-DNA von Übernachtskulturen der als positiv bestätigten Klone aus der Kolonie-PCR, wurde mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kits nach Herstellerangaben aufgereinigt. Die DNA wurde mit H₂O_{Nuklease-frei} eluiert und die Konzentration mittels Nanodrop bestimmt. Die anschließende Sequenzierung wurde durch die Firma Genart AG oder durch die Firma MWG Eurofins durchgeführt. Die so erhaltenen rekombinanten Plasmide konnten für die Transformation von verschiedenen Expressionsstämmen (siehe 2.10) eingesetzt werden.

2.8.10 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentration sowie die Reinheit von DNA-Proben wurden photometrisch mit dem Nanodrop ND-1000 und der zugehörigen Software (ND-1000 V 3.8.0) bestimmt. Das Gerät misst die Absorption von Lösungen in einem Bereich von 220–350 nm und berechnet daraus die DNA Konzentration in ng/µl.

Über das Absorptionsverhältnis 260/280 bzw. 260/230 nm konnte zudem die Reinheit der DNA überprüft werden.

2.9 Proteinbiochemische Methoden

2.9.1 Proteinkonzentrationsbestimmung

2.9.1.1 Konzentrationsbestimmung mittels BCA

Die Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration wurde mit einem BCA Protein Assay Kit durchgeführt. Entsprechend den Herstellerangaben wurden je 10 µl Probe bzw. Proteinstandard im Doppelansatz in einer 96-Well-Mikrotiterplatte vorgelegt und mit 200 µl Reaktionslösung vermischt. Die Reaktionslösung enthält Cu^{2+} und Bicinchoninsäure. Durch die Peptidbindungen der Proteine wird Cu^{2+} zu Cu^+ reduziert, welches mit der Bicinchoninsäure einen violett-gefärbten Komplex bildet. Dessen Absorption kann bei einer Wellenlänge von 562 nm gemessen werden. Als Proteinstandard diente BSA in Konzentrationen von 0 bis 2,0 mg/ml. Nach Inkubation für 30 min bei 37 °C unter leichtem Schütteln wurden die Proben in einem TECAN Platerader Infinite M200 Pro, welcher über die Software Magellan (V 7.1) gesteuert wurde, ausgewertet.

2.9.1.2 Bradford-Test

Der Bradford-Test (Bradford, 1976) diente zur qualitativen Kontrolle des Proteingehalts nach Proteinaufreinigung mittels IMAC. Hierbei wurden in einer 96-Well-Mikrotiterplatte 25 µl H_2O ^{Millipore} und 5 µl Proteinlösung mit 150 µl Bradford-Reagenz vermischt und die Ansätze visuell auf Blaufärbung überprüft. In saurer Lösung bindet der im Bradford-Reagenz enthaltene Triphenylmethanfarbstoff Coomassie-Brillant-Blue G-250 an kationischen und unpolaren Seitenketten von Proteinen. Durch diese Komplexbildung färben sich Lösungen, die Protein enthalten, blau.

2.9.1.3 Konzentrierung von Proteinlösungen

Proteinlösungen wurden vor der Gelfiltration oder vor der Kristallisation in VivaSpinTM-Zentrifugenröhrchen oder Amicon Ultra Centrifugal Filters mit dem jeweils geeigneten MWCO (Molecular Weight Cut Off) nach Herstellerangaben aufkonzentriert.

2.9.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Trennpuffer, pH 8,8	
Tris/HCl	1,5 M
SDS	0,4 % (w/v)

Sammelgelpuffer, pH 6,8	
Tris/HCl	0,5 M
SDS	0,4 % (w/v)

Laemmli-Laufpuffer, pH 8,3		Laemmli-Auftragspuffer (6x), pH 6,8	
Tris/HCl	250 mM	Tris/HCl	350 mM
Glycin	1,92 M	Glycerin	30 % (v/v)
SDS	1 % (w/v)	SDS	10 % (w/v)
		β -Mercaptoethanol	10 % (v/v)
		Bromphenolblau	0,02 % (w/v)

Die SDS-PAGE (Laemmli, 1970) wurde in einem Mini-Protean Tetra System durchgeführt. Die verwendeten Gele (standardmäßig 12%ige Polyacrylamidgele) hatten eine Größe von 10 x 8 cm und waren 1 mm dick. Trenn- und Sammelgel setzten sich wie folgt zusammen:

	Trenngel (12 %)	Sammelgel (5,7 %)
Trenngelpuffer	5 ml	---
Sammelgelpuffer	---	1,5 ml
Acrylamid 30 %	8 ml	1,5 ml
H ₂ O _{Millipore}	7 ml	4,8 ml
APS 10 % (w/v)	200 μ l	100 μ l
TEMED	20 μ l	10 μ l

Die Proben wurden vor dem Auftragen mit Laemmli-Auftragspuffer versetzt. Vom Proteinstandard (PageRuler Prestained, 10–170 kDa) wurden jeweils 5 μ l eingesetzt. Die Elektrophorese verlief bis zum Einlaufen der Proben in das Trenngel bei 10 mA pro Gel und konnte danach auf bis zu 30 mA pro Gel gesteigert werden.

Nach der SDS-PAGE erfolgte die Detektion der Proteine in den Polyacrylamidgelen durch 15–20-minütige Anfärbung mit Coomassie-Lösung. Die Entfärbung erfolgte für mehrere Stunden mit Entfärbelösung. Das Färben und Entfärben der Gele verlief unter leichtem Schütteln.

	Färbelösung	Entfärbelösung
Ethanol	30 % (v/v)	25 % (v/v)
Eisessig	10 % (v/v)	5 % (v/v)
Coomassie Brilliant Blue R250	0,1 % (w/v)	---

2.9.3 Native-PAGE

Die Native-PAGE ermöglicht es, Proteinkomplexe ohne vorherige Denaturierung und somit unter Beibehaltung ihrer endogenen Untereinheitenzusammensetzung zu trennen (Wittig und Schagger, 2009).

2.9.3.1 Clear Native Elektrophorese (CNE)

Die CNE (nach Wittig und Schagger, 2005) wurde in einem PerfectBlue™ Maxi Twin L System mit Wasserkühlung (4 °C) durchgeführt. Die Gele hatten eine Größe von 20 x 20 cm und waren 1,5 mm dick. Die Acrylamidlösung (AB-Mix) setzte sich aus 48,5 % (w/v) Acrylamid und 1,5 % (w/v) Bisacrylamid zusammen. Der Gradient des Trenngels wurde mit einem Gradientenmischer unter ständigem Rühren der Lösungen erzeugt. Die Proben wurden vor dem Auftragen mit Nativ-Auftragspuffer versetzt. Pro Geltasche wurde maximal 30 µg Protein aufgetragen. Vom Größenstandard (HMW) wurden je 10 µl verwendet.

Um die Proben in das Gel einlaufen zu lassen, wurde mit einer Spannung von 50 V für 30 min begonnen, dann verlief die Elektrophorese bei 300 V, 50 W und 5 mA pro Gel für 18 h. Ein 1,5 mm dickes Polyacrylamidgel, bestehend aus dem Trenngel (Gradient 5–13 % Acrylamid) und dem Sammelgel (4 % Acrylamid), setzte sich wie folgt zusammen:

	Trenngel (13 %)	Trenngel (5 %)	Sammelgel (4 %)
AB-Mix	5,5 ml	2,1 ml	1,2 ml
Nativ Gelpuffer (3x)	7 ml	7 ml	4 ml
Glycerin 50 % (v/v)	8,4 ml	---	---
H ₂ O _{Millipore}	---	11,8 ml	6,7 ml
APS 10 % (w/v)	100 µl	100 µl	100 µl
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl

Clear Native Gelpuffer (3x), pH 7,0	
BisTris	150 mM
ε-Aminocapronsäure	1,5 M
DDM	0,05 % (w/v)

Clear Native Kathodenpuffer, pH 7,25	
Imidazol	7,5 mM
Tricin	50 mM

Nativ-Auftragspuffer (10x)	
Glycerin	50 % (v/v)
Ponceau S	0,1 % (w/v)
in Kathodenpuffer	

Anodenpuffer, pH 7,0	
Imidazol	25 mM

Die pH-Werte von Anodenpuffer und Gelpuffer wurden mit konzentrierter HCl eingestellt. Der pH-Wert des Kathodenpuffers lag bei etwa pH 7,25 und wurde nicht durch Zugabe von Säure oder Lauge verändert.

Nach der CNE erfolgte die Detektion der Proteine in den Nativgelen durch 30-minütige Anfärbung mit Coomassie-Lösung, die Entfärbung erfolgte für mehrere Stunden mit Entfärbelösung (siehe 2.9.2). Das Färben und Entfärben der Gele verlief unter leichtem Schütteln.

2.9.3.2 Blue Native Elektrophorese (BNE)

Die BNE (nach Wittig *et al.*, 2006) wurde analog zur CNE durchgeführt mit der Ausnahme, dass im Blue Native Gelpuffer Imidazol anstelle von BisTris verwendet wurde und der Kathodenpuffer zusätzlich Coomassie Blue G-250 enthielt.

Blue Native Gelpuffer (3x), pH 7,0		Blue Native Kathodenpuffer, pH 7,0	
Imidazol	75 mM	Imidazol	7,5 mM
ϵ -Aminocapronsäure	1,5 M	Tricin	50 mM
DDM	0,05 % (w/v)	Coomassie Blue G-250	0,02 % (w/v)

Die pH-Werte von Gelpuffer und Kathodenpuffer wurden mit konzentrierter HCl eingestellt. Nach der BNE erfolgte die Detektion der Proteine in den Nativgelen durch 30-minütige Anfärbung mit Coomassie-Lösung, die Entfärbung erfolgte für mehrere Stunden mit Entfärbelösung (siehe 2.9.2). Das Färben und Entfärben der Gele verlief unter leichtem Schütteln.

2.9.4 Western Blot

2.9.4.1 Proteintransfer im Wetblot-Verfahren

Um Proteine mittels Western Blot spezifisch nachzuweisen, wurden diese nach erfolgter SDS-PAGE von den denaturierenden Polyacrylamidgelen auf eine Trägermembran (PVDF) übertragen. Dafür wurde eine Mini Trans Blot-Apparatur und ein kontinuierliches Puffersystem verwendet. Der Transferpuffer wurde vor Gebrauch frisch hergestellt.

Towbin-Transferpuffer (Towbin <i>et al.</i> , 1979)	
Tris	25 mM
Glycin	192 mM
Methanol p.A.	20 % (v/v)

Sowohl das Polyacrylamidgel als auch die Schwämme und das Whatmanpapier wurden zunächst für 20 min in Transferpuffer äquilibriert. Die Aktivierung der PVDF-Membran erfolgte für 7 min in Methanol. Für den Transfer wurden die verschiedenen Komponenten nach folgendem Schema geschichtet:

Kathode
Schwamm
2 x Whatmanpapier
Gel
PVDF-Membran
2 x Whatmanpapier
Schwamm
Anode

Der Transfer erfolgte über Nacht bei 30 V (konst.), 95 mA (max.) und 4 °C.

2.9.4.2 Immunologischer Nachweis durch alkalische Phosphatase

Der immunologische Nachweis von Proteinen erfolgte durch eine kolorimetrische Reaktion, welche von einer alkalischen Phosphatase vermittelt wurde (Blake *et al.*, 1984). Dabei diente BCIP als chromogenes Substrat, welches mittels NBT oxidiert, dimerisiert und anschließend als Indigofarbstoff auf der Trägermembran sichtbar wurde (dunkelviolettschwarzer Niederschlag).

Alle Schritte der Immundetektion erfolgten unter Schütteln und bei RT. Die PVDF-Membran wurde zunächst für 2 h in Blockierlösung (TBS-T, 2 % BSA (w/v)) inkubiert um freie Bindestellen abzusättigen. Anschließend wurde die Membran für weitere 2 h mit dem jeweiligen Primärantikörper (Konzentrationen von 1:100 bis 1:5000 in TBS-T, 0,3 % BSA (w/v)) geschüttelt. Nach zweimaligem Waschen mit TBS-T für je 10 min erfolgte die Inkubation mit dem jeweiligen Sekundärantikörper (Konzentration 1:2000 in TBS-T, 2 % BSA). Abschließend wurde die Membran zweimal mit TBS-T und einmal mit AP-Puffer für je 10 min gewaschen bevor die Färbung mit 66 µl NBT und 33 µl BCIP (je 50 mg/ml in 70 % DMF) in 10 ml AP-Puffer erfolgte.

2.9.4.3 Immunologischer Nachweis durch Fluoreszenz

Der immunologische Nachweis von Proteinen durch Fluoreszenz erfolgte analog zum kolorimetrischen Nachweis. Die Schritte bis zum Einsatz des Sekundärantikörpers waren in beiden Protokollen identisch. Die Inkubation mit dem fluoreszenten Sekundärantikörper (Konzentration 1:2000 in TBS-T, 2 % BSA) erfolgte dann allerdings im Dunklen bei RT für 1 h. Anschließend wurde die Membran zweimal mit TBS-T für je 10 min gewaschen. Die Auswertung der Blots erfolgte an einem Fujifilm FLA-5000 Scanner unter Verwendung des Filters Cy5 bei einer Wellenlänge von 635 nm und mit Hilfe der Programme Image Reader und AIDA.

2.9.5 Massenspektroskopie: MALDI-TOF MS/MS

Für eine spektroskopische Analyse mittels MALDI-TOF MS/MS wurden die zu untersuchenden Proteinbanden zuerst aus dem mit Coomassie gefärbten und über Nacht in Wasser eingelegten SDS-Gel herausgeschnitten und anschließend in kleine Stücke (Kantenlänge 1 mm) zerteilt, um die Reaktionsoberfläche für die weitere Behandlung zu vergrößern. Außerdem wurde ein Gelstück ohne Protein als Negativkontrolle mitgeführt. Anschließend wurden die Gelstückchen in 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und unter leichtem Schütteln für je 30 min in je 750 µl der folgenden Lösungen gewaschen:

- 1) 50 mM NH_4HCO_3
- 2) 50 mM NH_4HCO_3 , 25 % Acetonitril (v/v)
- 3) 25 % Acetonitril (v/v)
- 4) 50 % Acetonitril (v/v)

Danach wurden die Gelstücke für 1–2 h lyophilisiert. Der proteolytische Verdau mit Trypsin erfolgte über Nacht bei 37 °C. Die Trypsinkonzentration betrug 2 µg/100 µl Gelvolumen. Als Puffer wurde 50 mM NH_4HCO_3 verwendet, wobei nur maximal das 1,5-fache des Gelvolumens an Puffer zugegeben wurde. Die Extraktion der Peptide aus den Gelstücken erfolgte mit folgenden Lösungen:

- 1) 100 mM NH_4HCO_3
- 2) 100 mM NH_4HCO_3
- 3) 100 mM NH_4HCO_3 /Acetonitril (1:1)

Pro Extraktionsschritt wurde für 1–2 h mit dem 2–3-fachen des Gelvolumens inkubiert. Die Extrakte wurden dann in ein 0,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und über Nacht lyophilisiert. Der trockene Rückstand wurde zur Entfernung letzter NH_4HCO_3 -Reste in 50 µl $\text{H}_2\text{O}_{\text{Millipore}}$ aufgenommen und nochmals für 3–4 h lyophilisiert. Die massenspektrometrische Analyse und Identifizierung der so gewonnenen Peptide wurde freundlicherweise von Eduard Hochmuth am Institut für Biochemie der Universität Regensburg im Labor von Prof. Dr. Deutzmann an einem 4700 Proteomics MALDI-TOF MS/MS-Analyser durchgeführt.

2.10 Heterologe Expressionssysteme

Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein effizientes System für die heterologe Expression von verschiedenen Membranproteinen der beiden Archaeen *I. hospitalis* und *N. equitans* etabliert werden. Des Weiteren sollte ein MFS Protein von *T. kodakarensis* ebenfalls heterolog exprimiert werden. Zu diesem Zweck wurden sowohl prokaryotische als auch eukaryotische Expressionssysteme getestet.

2.10.1 Prokaryotische Expressionssysteme

2.10.1.1 Expression in *E. coli*

E. coli als bakterieller Expressionswirt zählt zu den am häufigsten genutzten Systemen, weil es sich vor allem durch einen relativ geringen Aufwand, die schnelle Generationszeit von *E. coli* sowie die zahlreichen verfügbaren Klonierungsvektoren und Expressionsstämme auszeichnet (Terpe, 2006).

2.10.1.1.1 Transformation

Die Transformation der *E. coli* Expressionsstämme mit rekombinanten Plasmiden erfolgte wie unter 2.8.7 beschrieben. Allerdings erfolgte nach der Transformation keine Kolonie-PCR. Die erhaltenen Klone wurden stattdessen direkt für die Proteinexpression verwendet.

2.10.1.1.2 IPTG-induzierte Expression

Mit Ausnahme des pBAD Vektors (Arabinose Induktion) ließen sich alle hier verwendeten Plasmide für die *E. coli* Expressionen (siehe 2.6) mit IPTG induzieren.

Die Expressionen erfolgten unter Selektionsbedingungen durch Zugabe der jeweiligen Antibiotika. Für jeden Expressionsansatz wurden zunächst Vorkulturen in LB-Medium von Klonen einer frischen Transformationsplatte angelegt. Die Kultivierung dieser Flüssigkulturen erfolgte üN unter Schütteln (200 rpm) bei 37 °C. Am nächsten Tag wurde das jeweilige Expressionsmedium (LB oder 2YT) mit einer OD₆₀₀ von 0,1 angeimpft und die Kulturen bei 37 °C und 120–150 rpm inkubiert. Das Wachstum wurde in regelmäßigen Abständen kontrolliert und nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,6–1,0 wurden die Zellen induziert (0,1–1 mM Induktor). Nach der Induktion wurden die Kulturen entweder für 3–6 h oder üN bei 30 oder 37 °C weiter bebrütet. Für manche Expressionen wurden die Zellen nach der Induktion auf 20 °C abgekühlt und üN weiter inkubiert.

2.10.1.1.3 Ernte

Nach erfolgter Expression wurden die *E. coli* Zellen für 20 min bei 4000 rpm (Avanti J-26-XP, Rotor JLA 8.1) und 4 °C geerntet und das Pellet im entsprechenden Membranpuffer (siehe 2.11) resuspendiert. Die *E. coli* Zellsuspensionen wurden entweder sofort nach der Ernte aufgeschlossen oder bei -80 °C bis zum weiteren Gebrauch aufbewahrt.

2.10.1.1.4 Green Fluorescent Protein (GFP)-basierte Optimierung der Expression

Das in dieser Arbeit unter anderem verwendete Plasmid pTTQ18_GFP besaß neben einem His-Tag einen zusätzlichen GFP-Tag. GFP emittiert nach Anregung mit UV-Licht (Anregungsmaximum: 395 nm) oder blauem Licht (Anregungsmaximum: 475 nm) grünes Licht bei einer Wellenlänge von circa 509 nm. Diese Fähigkeit konnte für die Optimierung der Expressionsbedingungen für Membranproteine genutzt werden. Nur nach einer erfolgreichen Expression des Zielproteins und dessen Einbau in die Membran der Wirtszelle, wird auch GFP korrekt gefaltet und kann fluoreszieren. Das hier verwendete Protokoll basierte auf einer Anleitung von Drew *et al.* aus dem Jahr 2006.

Die Fluoreszenz wurde in ganzen *E. coli* Zellen gemessen. Nach erfolgter Proteinexpression wurden Aliquots der IPTG-induzierten Kulturen abgenommen, die Zellen sedimentiert (Microcentrifuge MC-13, Rotor 3324, 5000 rpm, 15 min, 4 °C) und in PBS-Puffer (1x; 140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄) resuspendiert. Je 200 µl dieser Zellsuspensionen wurden in eine schwarze 96-well Platte überführt und die Fluoreszenz mit Hilfe des TECAN Infinite M200 Pro Plate Readers und des Programms Magellan V 7.1 ermittelt. Das GFP wurde dabei mit einer Wellenlänge von 485 nm angeregt und die Emission bei 535 nm gemessen. Als Negativkontrolle dienten dabei eine nicht induzierte *E. coli* Kultur sowie eine Probe des PBS-Puffers.

Durch die hohe Sensitivität der Methode genügte es, die Expressionen im 5 ml Maßstab durchzuführen. Somit konnten im *small-scale* Volumen sehr schnell viele verschiedene Expressionsbedingungen getestet werden und eine Optimierung im High-Throughput Verfahren stattfinden. Außerdem diente der GFP-Tag dazu, dass Zielprotein während der Membranpräparation, Solubilisierung sowie Reinigung (siehe 2.11–2.13) nicht nur durch immunologischen Nachweis mittels Western Blot sondern auch durch Anregung der PVDF-Membranen in einem Fujifilm FLA-5000 Scanner unter Verwendung einer Wellenlänge von 473 nm zu verfolgen.

2.10.1.2 Expression in *P. furiosus*

Gerade für die Expression von archaeeellen Proteinen ist es naheliegend sich eines archaeeellen Expressionswirtes wie *P. furiosus* zu bedienen. Da *P. furiosus* zudem ein hyperthermophiler Organismus ist, besitzt dieses System gerade bei der Expression von Proteinen hyperthermophilen Ursprungs, im Vergleich zu mesophilen Expressionssystemen, Vorteile (Waege *et al.*, 2010). Die Expression in *P. furiosus* wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Dr. Winfried Hausner (Universität Regensburg) durchgeführt.

2.10.1.2.1 Transformation

***P. furiosus* Transformationspuffer (Waage *et al.*, 2010)**

pH 7,0 (HCl)

CaCl ₂ x 2 H ₂ O	80 mM
C ₃ H ₃ NaO ₃	40 mM
NH ₄ Cl	4,7 mM
½ SME (ohne KH ₂ PO ₄)	ad 1000 ml

Für die Transformation wurden zunächst frische Übernachtskulturen von *P. furiosus* angezüchtet (70–75 °C, ½ SME-Stärke-Medium, 0,8–1 bar N₂, 45–70 rpm). Die Transformation mit den jeweiligen entsprechenden rekombinanten Plasmiden erfolgte in der Anaerobenkammer unter sauerstofffreien Bedingungen. Pro Transformationsansatz wurden 3 ml Zellkultur abzentrifugiert (6000 g, 10 min) und die Zellpellets in je 100 µl Transformationspuffer resuspendiert. Die Ansätze wurden in 0,5 ml Eppendorfgefäße überführt und im Thermocycler mit folgendem Programm inkubiert:

Schritt	Temperatur	Dauer
1	4 °C	90 min (nach 30 min: Zugabe von 600 ng Plasmid-DNA)
2	85 °C	3 min
3	4 °C	10 min

Als Kontrolle wurden je ein Ansatz ohne Plasmid-DNA und ein Ansatz mit dem Leervektor pYS3 mitgeführt. Die Transformationsansätze wurden vollständig in 20 ml Flüssigmedium (½ SME-Stärke-Medium, 0,8–1 bar N₂) mit 10 µM Simvastatin überimpft und bei 85 °C bei 45–70 rpm für 30 bis maximal 48 h inkubiert. Das Wachstum wurde regelmäßig lichtmikroskopisch überprüft. Von der angewachsenen Kultur wurden verschiedene Verdünnungen angefertigt und auf Gelrite-Platten (mit 10 µM Simvastatin) plattiert. Die Platten wurden bei 85 °C für 48 h in einem Anaerobentopf (0,5 bar N₂) inkubiert.

Sobald auf den Gelrite-Platten Einzelkolonien gewachsen waren, konnten diese Klone mit einer sterilen Kanüle (gelb, Ø 0,90 x 40 mm) „ausgestochen“ und in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt werden. Die Zellen wurden in 1,5 ml Medium resuspendiert und in 20 ml Medium (½ SME-Stärke-Medium, 0,8–1 bar N₂) überimpft. Die Ansätze wurden bei 85 °C schüttelnd inkubiert und das Wachstum lichtmikroskopisch überprüft. Wenn die Kulturen eine Dichte von 4 x 10⁸ Zellen/ml erreicht hatten, wurde eine gDNA-Isolierung der Klone durchgeführt. Die Aufreinigung erfolgte mit dem ReliaPrep™ gDNA Tissue Miniprep System nach Herstellerangaben. Die Konzentration der aufgereinigten gDNA wurde mittels Nanodrop (siehe 2.8.10) gemessen. Zur Überprüfung des Klonierungserfolges wurden von den gDNAs der *P. furiosus* Klone PCRs angesetzt (siehe 2.8.1).

2.10.1.2.2 Pyruvat induzierte Expression

Die durch PCR positiv bestätigten *P. furiosus* Klone wurden in Expressionsmedium (½ SME-Pyruvat-Medium) angeimpft. Das Wachstum unter glukoneogenetischen Bedingungen führte zu einer Aktivierung des PF0613 Promotors. Dieser war auf den entsprechenden rekombinanten Plasmiden dem jeweiligen Gen von Interesse vorangestellt. Pyruvat konnte somit als Energiequelle genutzt werden und die Expression wurde gleichzeitig induziert.

Die Expression fand entweder in 120 ml Serumflaschen oder in einem 15 l Fermenter statt. In den 20 ml Ansätzen erfolgte das Wachstum der Zellen bei 85 °C unter Schütteln (45–70 rpm) und mit 0,5 bar N₂ in der Gasphase. Im 15 l Fermenter wurden die Zellen ebenfalls bei 85 °C unter Rühren (100 rpm) und Überschichtung mit N₂ (2 bar) gezüchtet. Das Wachstum wurde in regelmäßigen Abständen von etwa 1,5 h durch Auszählen mit einer Thoma-Zählkammer kontrolliert.

2.10.1.2.3 Ernte

Nach Erreichen einer Zelldichte von 2×10^8 Zellen/ml wurden die Expressionsansätze geerntet. Die Kulturen aus den 120 ml Serumflaschen wurden bei 4000 rpm (Avanti J-26-XP, Rotor JLA-16.250) für 30 min bei RT sedimentiert. Die Fermenterkulturen wurden mittels Durchflusszentrifuge ebenfalls bei 4000 rpm (Contifuge Stratos, Rotor 3049) und RT geerntet.

Die *P. furiosus* Zellpellets wurden in entsprechendem Membranpuffer (siehe 2.11) resuspendiert und entweder sofort danach aufgeschlossen oder bei -80 °C bis zum weiteren Gebrauch aufbewahrt.

2.10.1.3 Expression in *T. kodakarensis*

Alle Schritte der Transformation, Expression und Ernte von *T. kodakarensis* wurden an der Universität Kyoto (Japan) im Labor von Prof. Dr. Haruyuki Atomi durchgeführt.

2.10.2 Eukaryotische Expressionssysteme

2.10.2.1 Expression in *P. pastoris*

Die einzellige methylotrrophe Hefe *P. pastoris* (eigentlich *Komagataella pastoris*) ist ein mittlerweile weit verbreiteter rekombinanter Expressionswirt. *P. pastoris* vereint die Vorteile eines benutzerfreundlichen Systems und hoher Wachstumsraten mit eukaryotischen co- und posttranslationalen Modifikationen (Byrne, 2015).

2.10.2.1.1 Transformation

Die Transformation von elektrokompenten *P. pastoris* Zellen (Stamm SMD1163) mit dem rekombinanten Plasmid pPIC3.5k wurde freundlicherweise von Dr. Eva Schweikhard (MPI für Biophysik, Frankfurt) durchgeführt. Auch die Auswahl der positiven Klone, welche mehrere verschiedene Selektionsschritte beinhaltet, wurde ebenfalls von Dr. Eva Schweikhard vorgenommen.

Von dem Klon mit dem höchsten Expressionslevel wurden Glycerinstocks zur dauerhaften Aufbewahrung angelegt und diese bei -80 °C aufbewahrt. Zum Anlegen der Glycerinstocks wurden *P. pastoris* Zellen in YPD-Medium zu einer OD₆₀₀ von 1–2 bei 30 °C angezogen, Glycerin in einer Endkonzentration von 30 % (v/v) zugegeben und die Zellen in 1 ml Fraktionen aliquotiert.

2.10.2.1.2 Methanol-induzierte Expression

Der hier verwendete pPIC3.5k Vektor enthält den starken AOX1 Promotor, welcher durch Glycerin unterdrückt und durch Methanol induziert wird. Ist also Methanol als Kohlenstoff- und Energiequelle vorhanden, wird die Proteinexpression des jeweiligen Gens von Interesse herbeigeführt.

Alle im Folgenden beschriebenen Arbeiten erfolgten unter sterilen Bedingungen in einer Sicherheitswerkbank mit autoklavierten oder heißluftsterilisierten Materialien und autoklavierten sterilfiltrierten Lösungen.

Für die Expressionsansätze wurden zunächst Zellen aus dem Glycerinstock auf YPD-Platten ausgestrichen und diese bei 30 °C für 48 h inkubiert. Ausgehend von den plattierten *Pichia*-Klonen wurden entsprechende Flüssigkulturen in YPD-Medium angelegt. Die Kultivierung der *P. pastoris* Flüssigkulturen erfolgte unter Schütteln (120–150 rpm) bei 30 °C. Die Verdopplungszeit von *P. pastoris* betrug während der logarithmischen Wachstumsphase etwa 2 h. Um die Kulturen auf eine definierte optische Dichte zu einem bestimmten Zeitpunkt einzustellen, wurde folgende Formel verwendet:

$$N = N_0 e^{\sigma t}$$

N = Finale OD₆₀₀ (optische Dichte die nach t Stunden erreicht sein sollte)

N_0 = Start OD₆₀₀ (optische Dichte um nach t Stunden eine OD₆₀₀ von N zu erreichen)

σ = 0,346 für YPD-Medium und 0,231 für MGY-Medium

t = Wachstumszeit in h

Die Formel wurde nach N_0 aufgelöst und mit dem daraus resultierenden Wert konnte das Volumen (V_1), mit dem die Kultur angeimpft werden musste, ermittelt werden:

$$V_1 = \frac{N_0 V_0}{N_1}$$

V_0 = Gesamtvolumen des Kultivierungsansatzes

N_1 = OD₆₀₀ der Vorkultur

Die YPD-Flüssigkulturen dienten zum Animpfen von *P. pastoris* Vorkulturen in MGY-, BMG- oder BMGY-Medium. Nachdem die Glycerin-Vorkulturen die zuvor festgelegte OD₆₀₀ (zwischen 4,0 und 8,0) erreicht hatten, wurden die Zellen bei 4200 rpm (Avanti J-26-XP, Rotor Rotor JLA 8.1) und 4 °C für 20

min sedimentiert. Zur Induktion der Expression wurden die Zellen auf eine OD₆₀₀ von 1,0 in der entsprechenden Menge MM-, BMM- oder BMMY-Medium resuspendiert und für 24 h inkubiert.

2.10.2.1.3 Ernte

Nach erfolgter Expression wurden die *P. pastoris* Zellen für 20 min bei 4200 rpm (Avanti J-26-XP, Rotor JLA 8.1) und 4 °C geerntet und das Pellet im entsprechenden Membranpuffer (siehe 2.11) resuspendiert. Die *P. pastoris* Zellsuspensionen wurden entweder direkt nach der Ernte aufgeschlossen oder bei -80 °C bis zum weiteren Gebrauch aufbewahrt.

2.10.2.2 Expression in Sf9 Insektenzellen

2.10.2.2.1 Baculovirus vermittelte Proteinexpression in Insektenzellen (Sf9)

Das *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (AcNPV) wird auch als Baculovirus bezeichnet und infiziert Insektenzellen, indem es sein Genom in die Wirtszelle einschleust. Zur eigenen Vermehrung nutzt es den Proteinbiosyntheseapparat des Wirtes und nach Lyse der Insektenzellen werden neue Viren freigesetzt (Hitchman *et al.*, 2009). Mittels des hier verwendeten flashBAC™ Systems wurden durch homologe Rekombination zwischen Transfervektor und Virus DNA rekombinante Viren, zur Infektion von Sf9 Insektenzellen, erzeugt. In dieser Arbeit wurde der Transfervektor pVL1393 verwendet. Die Klonierung des Gens von Interesse und die Ligation mit pVL1393 fanden in *E. coli* statt. Die Sf9 Insekten-Zelllinie entstammt Ovarzellen der Mottenart *Spodoptera frugiperda*. Die Verdopplungszeit lag bei 24–48 h bei einer konstanten Temperatur von 27 °C. Die Zellen wurden sowohl in Monolayer- als auch in Suspensionskulturen angezogen. Alle im Folgenden beschriebenen Arbeiten mit Sf9 Insektenzellen erfolgten unter sterilen Bedingungen in einer Sicherheitswerkbank mit autoklavierten oder heißluftsterilisierten Materialien bzw. Geräten oder sterilfiltrierten Lösungen. Zum Ausschluss etwaiger Mykoplasmen-Kontaminationen wurden die Zellkulturen in regelmäßigen Abständen mittels DAPI-Färbung überprüft.

2.10.2.2.2 Monolayerkulturen

Für die adhärente Kultivierung der Sf9 Zellen wurden in einer 25 cm² Kulturflasche etwa 1–1,5 x 10⁶ Zellen in 5 ml Kulturmedium ausgesät. Die Konfluenz wurde täglich mit dem Mikroskop überprüft. Nach 2 Tagen erfolgte jeweils ein kompletter Medienaustausch. Nach Ausbildung eines vollständigen Monolayers wurden die Zellen passagiert. Dafür wurden die Zellen nach einmaligem Waschen mit 5 ml frischem Medium mit 1 ml Trypsin und Inkubation bei 37 °C für 5 min enzymatisch abgelöst. Anschließend wurde die Zellzahl der Kultur bestimmt und die suspensierten Zellen nach entsprechender Verdünnung in frischem Medium in eine neue 25 cm² bzw. 75 cm² Kulturflasche (5 bzw. 15 ml Kultivierungsvolumen) überführt. Sobald wieder eine vollständige Konfluenz erreicht war, wurden die Zellen erneut passagiert.

2.10.2.2.3 Suspensionskulturen

Um Schüttelkulturen anzulegen, sollten sich die Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase befinden und eine minimale Dichte von $2-5 \times 10^5$ Zellen/ml aufweisen. Ausgehend von Monolayerkulturen benötigten die Zellen 4–5 Tage, um eine Zelldichte von mehr als 1×10^6 Zellen/ml zu erreichen, von Suspensionskulturen dagegen nur circa 3 Tage. Die Kultivierung erfolgte in Erlenmeyerkolben unter Schütteln bei 125 rpm und in einem Volumen von 50 ml (250 ml Kolben), 100 ml (500 ml Kolben) oder 500 ml (2000 ml Kolben). Die Erlenmeyerkolben wurden mit Aluminiumdeckeln verschlossen. Wenn die Zellen eine Dichte von $1-2 \times 10^6$ Zellen/ml erreicht hatten, wurden sie mit frischem Medium auf die ursprüngliche Dichte von $2-5 \times 10^5$ Zellen/ml verdünnt. Das Wachstum und die Viabilität der Suspensionskulturen wurden regelmäßig mikroskopisch überprüft und die Zellzahl mittels Neubauer Zählkammer bestimmt. Zur Verhinderung von starker Schaumbildung wurde den Kulturen zum Teil 0,1 % (v/v) Pluronic® F-68 zugesetzt.

2.10.2.2.4 Konservierung und Auftauen von Zellen

Zum Anlegen von Zellkonserven wurde zunächst die Viabilität der Zellen überprüft und die Lebendzellzahl bestimmt. Dazu wurden die Zellen in einem Verhältnis von 1:2 mit dem Farbstoff Trypanblau versetzt (0,4%ige Lösung, Sigma Aldrich GmbH, Taufkirchen) und in einer Neubauer Zählkammer ausgezählt. Tote Zellen wurden durch den Farbstoff blau angefärbt und konnten somit klar von den lebenden Zellen unterschieden werden.

Zellen einer gesunden Sf9 Kultur (mindestens 90 % lebend $\approx 1 \times 10^6$ Zellen/ml), die sich in der exponentiellen Wachstumsphase befanden, wurden durch Zentrifugation bei 300 g für 5 min bei RT geerntet und das Pellet in frischem Medium (finale Konzentration 1×10^7 Zellen/ml) resuspendiert. Zum Einfrieren wurde dem Medium 20 % (v/v) FBS und 10 % (v/v) DMSO zugegeben. DMSO fungierte als Gefrierschutzmittel und verhinderte intrazelluläre Eisbildung. Die Zellsuspension wurde in Kryoröhrchen aliquotiert, schrittweise eingefroren (-20°C : 1 h; -80°C : 1–2 h) und schließlich in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

Das Auftauen der Sf9 Zellen musste im Gegensatz zum Einfrieren zügig geschehen. Nach Entnahme eines Zellaliquots aus flüssigem Stickstoff wurde es im Wasserbad bei 27°C aufgetaut. Die aufgetauten Zellen wurden vorsichtig in 10 ml vorgewärmtes Medium transferiert, vorsichtig gemischt und bei 300 g für 5 min bei RT sedimentiert. Danach wurde das Pellet in 5 ml frischem Medium resuspendiert und die Zellsuspension in eine 25 cm^2 Kulturflasche überführt. Die Kultivierung erfolgte bei 27°C . Die Konfluenz wurde täglich mikroskopisch überprüft und die Zellen nach Ausbildung eines Monolayers entsprechen passagiert.

2.10.2.2.5 Herstellung rekombinanter Baculoviren

Zur Herstellung rekombinanter Baculoviren wurde das flashBAC™ System der Firma Oxford Expression Technologies genutzt (Abb. 7). Dabei kommt es zu einer homologen Rekombination zwischen einem Transfervektor, welcher das zu untersuchende Gen enthält, und der zur Verfügung gestellten Virus DNA (flashBAC). Bei dieser sogenannten Cotransfektion wird nicht nur das zu exprimierende Gen in die DNA des Virus integriert, sondern auch die Funktion eines für die Replikation und Produktion von Viruspartikeln essentiellen Genes (ORF1629) wiederhergestellt. Somit ist auch keinerlei Selektion notwendig, da sich nicht-rekombinante Viren auch nicht replizieren können.

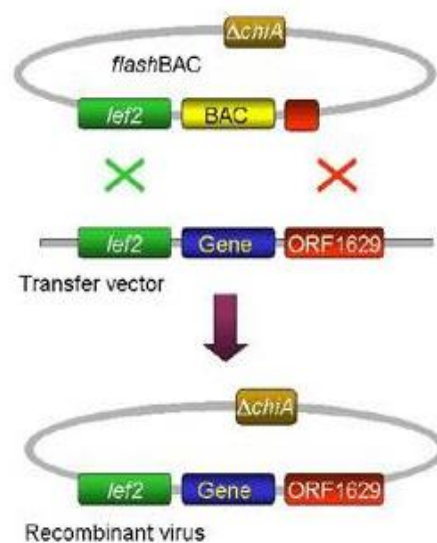


Abbildung 7: Schematische Darstellung zur Herstellung rekombinanter Baculovirus DNA durch homologe Rekombination mittels flashBAC™ System. (User Guide Oxford Expression Technologies, 2008)

Wie vom Hersteller empfohlen, wurden sowohl die Herstellung als auch die Amplifikation der Viren serum- und antibiotikafrei durchgeführt.

Da auch schon die homologe Rekombination in Insektenzellen stattfand, wurden in einer 35 mm² Zellkulturschale zunächst gesunde Sf9 Zellen in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml in einem Volumen von 2 ml Medium ausgesät. Damit die Zellen einen Monolayer ausbilden konnten, wurden sie für 1 h bei RT inkubiert. Danach wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt und je 1 ml des sogenannten Cotransfektionsmix tröpfchenweise zu den adhären Zellen gegeben. Die Cotransfektionsmische setzten sich wie folgt zusammen:

1 ml serumfreies Medium

10 µl Lipofectin® Reagenz

5 µl flashBAC Virus DNA (100 ng)

5 µl Transfervektor DNA (pVL1393 + Insert oder Kontrollvektor, je 500 ng)

Der Cotransfektionsmix für die Negativkontrolle enthielt keinerlei DNA. Alle drei Ansätze wurden vor Verwendung für 15 min bei RT inkubiert.

Das Lipofectin® Reagenz besteht 1+1 (w/w) aus dem kationischen Lipid N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-n,n,n-trimethylammoniumchlorid (DOTMA) und dem Phospholipid Dioleoyl Phosphatidylethanolamin (DOPE) und sorgt dafür, dass Viren DNA und Transfervektor von den Insektenzellen aufgenommen werden. Durch die positive Ladung des Lipofectin® Lipidgemisches wird negativ geladene DNA gebunden und die entstehenden Liposom-DNA-Komplexe können mit der Zellmembran der Sf9 Zellen fusionieren.

Die Zellkulturschalen wurden für insgesamt 5 Tage bei 27 °C in einer feuchten Plastikbox bebrütet. Nach einem Tag wurde nochmals 1 ml frisches Medium zugegeben. Nach Ende der Inkubationsperiode erfolgte die Ernte durch Zentrifugation bei 3000 rpm (Allegra X-15R, Rotor SX4750A) für 15 min bei 4 °C. Der Überstand, der die rekombinanten Viren enthielt, wurde als P1 bezeichnet und stellte die jeweilige Virus-Stammkultur dar. Diese wurde bei 4 °C im Dunklen bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt. Für weitere Experimente musste der P1 Virusbestand jedoch noch amplifiziert werden. Dafür wurde zu Sf9 Zellen in 100 ml Suspensionskultur ($1\text{--}2 \times 10^6$ Zellen/ml) insgesamt 0,5 ml P1 zugegeben und die Zellen bis zur vollständigen Infektion bei 125 rpm und 27 °C inkubiert (circa 4–5 Tage). Infizierte Zellen blähten sich einheitlich rund auf und besaßen einen klar erkennbaren vergrößerten Zellkern. Der Infektionserfolg wurde täglich mikroskopisch überprüft. Die Ernte erfolgte bei 3000 rpm (Allegra X-15R, Rotor SX4750A) für 15 min bei 4 °C. Der Virus befand sich wiederum im Überstand, wurde als P2 bezeichnet und konnte bei 4 °C im Dunkeln aufbewahrt werden.

2.10.2.2.6 Plaque-Assay zur Bestimmung des Virustiters

Um die Sf9 Zellen mit einer definierten Viruszahl infizieren zu können, musste der Virustiter zunächst quantitativ bestimmt werden. Zu diesem Zweck wurde ein Plaque-Assay durchgeführt. Zunächst wurden in zehn 35 mm² Kulturschalen je 1×10^6 Zellen/ml in 2 ml Medium ausgesät und für 1 h bei RT adhärirt. Danach wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt und tröpfchenweise je 100 µl von verschiedenen Verdünnungen (10^{-4} – 10^{-7}) des P2 Virusbestandes zu den Zellen pipettiert. Für jede Verdünnungsstufe wurden Duplikate angelegt und zusätzlich zwei Negativkontrollen mit je 100 µl Medium mitgeführt. Alle Ansätze wurden für 1 h bei RT inkubiert. Da die Zellen anschließend mit Agarose überschichtet werden mussten, wurde eine 2%ige Low Gelling Temperature Agarose-Lösung (in 10 ml H₂O_{Millipore}, w/v) zuerst im Wasserbad aufgeschmolzen und auf circa 50 °C abgekühlt. Dann wurden 10 ml Kulturmedium hinzugegeben.

Nach Ende der Inkubationsperiode wurde das Virusinokulum vorsichtig abgenommen, die Zellen zweimal mit frischem Kulturmedium gewaschen und anschließend je 2 ml der vorbereiteten Agarosebeschichtung zugegeben. Zur Verfestigung der Agarose wurden die Kulturschalen 15 min bei

RT inkubiert. Auf die Agaroseschicht wurde am Ende zusätzlich noch 1 ml Kulturmedium pipettiert. Die so präparierten Zellkulturschalen wurden in einer feuchten Plastikbox bei 27 °C für 3–4 Tage inkubiert. Danach sollten die Zellen einen konfluenten Monolayer ausgebildet haben. Zur Visualisierung der Virusplaques wurde eine Färbung mit Neutralrot durchgeführt. Die Neutralrot Stammlösung (5 mg/ml in H₂O_{Millipore}) wurde dafür 1:20 mit 1x PBS-Puffer (100 mM NaCl, 80 mM Na₂HPO₄, 20 mM NaH₂PO₄, pH 6,2) verdünnt. Der flüssige Überstand der Zellkulturschalen wurde abgenommen und mit je 1 ml der Färbelösung ersetzt. Nach Inkubation für 3–4 h bei 27 °C wurde die Neutralrotlösung abpipettiert und die Schalen zusätzlich auf einem Papiertuch umgedreht abgetropft. Da nur lebende Zellen den Farbstoff aufnehmen können, erschienen die Plaques als weiße Zonen gegen einen roten Hintergrund. Falls nötig, wurden die Zellkulturschalen zur besseren Herausbildung der Plaques für einige Zeit ins Dunkle gestellt. Zur Auswertung wurden die Plaques aller Ansätze ausgezählt. Idealerweise wurden die Duplikate einer Verdünnungsstufe mit einer Anzahl von Plaques zwischen 10 und 30 zur Berechnung des Virustiters herangezogen. Dieser wurde dann mit folgender Formel bestimmt:

$$\text{Virustiter (pfu/ml)} = \text{Mittelwert der gezählten Plaques} \times \text{Verdünnungsstufe} \times 10$$

Die Konzentration des Virustiter, also die Menge an infektiösen Viruspartikeln, wird typischerweise in *plaque forming units* (pfu) je Milliliter angegeben.

2.10.2.2.7 Transfektion einer Suspensionskultur

Für die Proteinexpression wurden Sf9 Zellen in Suspensionskultur zunächst auf eine Konzentration von $2,5\text{--}3 \times 10^6$ Zellen/ml eingestellt. Danach wurden die Zellen mit rekombinanten Baculoviren (P2) infiziert. Zu beachten ist hierbei der sogenannte MOI-Wert (*multiplicity of infection*), welcher das zahlenmäßige Verhältnis von infektiösen Viruspartikeln zu deren Zielzellen beschreibt (Flint, 2004). Dabei muss die Anzahl der Viren durch die Anzahl der zu infizierenden Zellen geteilt werden. Bei einem MOI-Wert von 1 werden zum Beispiel genauso viele Viruspartikel eingesetzt, wie sich Zellen in der Kultur befinden. Für Expressionsstudien sollte mit einem hohen MOI (5–10) infiziert werden, um sicherzustellen, dass alle Zellen möglichst gleichzeitig infiziert werden.

Nach Zugabe eines entsprechenden P2 Virusinokulums wurden die Zellen für 48 bzw. 72 h bei 27 °C schüttelnd inkubiert. Das zu exprimierende Gen unterlag der Kontrolle des Polyhedrin Promoters. Dieser wird in der späten Phase der Virusreplikation aktiviert und induziert die Proteinproduktion.

Die Ernte erfolgte für 20 min bei 4000 rpm (Allegra X-15R, Rotor SX4750A) und 4 °C. Das Zellpellet wurde im entsprechenden Membranpuffer (siehe 2.11) resuspendiert. Die Sf9 Zellsuspensionen wurden entweder sofort nach der Ernte aufgeschlossen oder bei -80 °C bis zum weiteren Gebrauch aufbewahrt.

2.11 Zellaufschluss und Membranpräparation

Nach der Ernte wurde den Zellsuspensionen jeweils 0,05 % (w/v) DNase I und 0,01 % (w/v) Pefabloc® SC zugefügt. Danach folgte der Aufschluss der Zellen mit einem Hochdruckzellaufschluss-System (Cell Disruptor) bei erforderlichem Druck (*E. coli*: 1,8 kbar, SF9: 2,3 kbar, *P. pastoris*: 2,7 kbar). Der Cell Disruptor wirkt wie eine Kombination aus French Press und Microfluidizer, weshalb die verschiedenen Zelltypen sehr effizient aufgebrochen werden können. Durch den Anschluss des Systems an eine Wasserkühlung wurde verhindert, dass sich die Proben während des Aufschlusses erwärmen.

Um unaufgeschlossene Zellen und Zelltrümmer abzutrennen, erfolgte eine Lowspin-Zentrifugation der Zelllysate bei 12.500 rpm (Avanti J-26-XP, Rotor JLA-16.250) für 30 min bei 4 °C. Zur Gewinnung der Membranen wurden die Überstände abgenommen und diese für eine weitere Stunde bei 45000 rpm und 4 °C ultrazentrifugiert (Highspin, Optima XPN-100, Rotor Ti45). Das Membranpellet wurde im jeweiligen Membranpuffer mit Hilfe eines Homogenisators resuspendiert.

P. furiosus Zellsuspensionen wurden zur vollständigen Lyse erst sonifiziert und danach mit Hilfe von Glasbeads in einem FastPrep®-24 Homogenisator aufgeschlossen. Nach einer Lowspin-Zentrifugation bei 4500 rpm (Avanti J-26-XP, Rotor JLA-16.250) für 15 min bei 4 °C wurden die Überstände zur Gewinnung der Membranen für 1 h bei 40000 rpm (Optima XPN-100, Rotor Ti45) und 4 °C zentrifugiert. Die Pellets wurden im entsprechenden Membranpuffer resuspendiert.

Die Membranfraktionen wurden zusammen mit den Überständen nach der Highspin-Zentrifugation und den resuspendierten Lowspin-Pellets mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Die homogenisierten Membranen wurden auf eine totale Proteinkonzentration von 10 mg/ml eingestellt, zu je 5–15 ml aliquotiert und direkt im Anschluss für die Aufreinigung verwendet oder bei -80 °C gelagert.

Membranpuffer	
Expressionswirt	Zusammensetzung
<i>E. coli</i>	50 mM Tris pH 7,5, 300 mM NaCl (für Neq014 von <i>N. equitans</i>) oder 50 mM NaPi pH 7,5, 300 mM NaCl (für Proteine von <i>I. hospitalis</i> und <i>T. kodakarensis</i>)
<i>P. furiosus</i>	50 mM Tris pH 7,5, 200 mM NaCl, 20 mM Imidazol
<i>P. pastoris</i>	50 mM Tris pH 7,5, 200 mM NaCl, 10 % (v/v) Glycerin
Sf9	50 mM Tris pH 7,5, 200 mM NaCl, 10 % (v/v) Glycerin

Der Natriumphosphatpuffer (NaPi) wurde durch Titration aus einer 500 mM Na₂HPO₄ und einer 500 mM NaH₂PO₄ Stammlösung hergestellt.

2.12 Solubilisierung

Um die zu untersuchenden Membranproteine aus den präparierten Membranen heraus lösen zu können, wurden diese mit Detergenz behandelt.

Die Solubilisierungseffizienz verschiedener Detergenzien wurde für jedes erfolgreich exprimierte Membranprotein separat ermittelt. Für die Detergenz Screenings wurde je 1 ml der homogenisierten Membranen (10 mg/ml) mit 200 µl Detergenz (10 % Stammlösung; Endkonzentration 1,67 %) versetzt und für 1 h bei RT schüttelnd inkubiert. Die Solubilisierungsansätze wurden anschließend für 1 h bei 70000 rpm (Optima Max-XP, Rotor MLA-130) und 4 °C zentrifugiert. Die Pellets wurden in 1 ml Membranpuffer resuspendiert und zusammen mit dem Solubilisat mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert.

Nach Auswahl eines geeigneten Detergenz, wurden die Membranen je nach folgendem Reinigungsansatz in einem Gesamtvolumen von 5 oder 20 ml solubilisiert. Hierfür wurde zu den homogenisierten Membranen (totale Proteinkonzentration *E. coli*/*P. furiosus* Membranen: 10 mg/ml; *P. pastoris* Membranen: 5 mg/ml) das gewünschte Detergenz (10%ige Stammlösung) tröpfchenweise zugegeben. Die Endkonzentration des Detergenz im Solubilisierungsansatz betrug dabei immer 2 % (v/v). Die Solubilisierung erfolgte für prokaryotische Membranen unter Schütteln für 1 h bei RT. Membranen aus eukaryotischen Expressionen wurden auf Eis bei 4 °C für 1 h oder üN solubilisiert. Nicht-solubilierte Membranfragmente wurden durch eine anschließende Zentrifugation bei 70.000 rpm (Optima Max-XP, Rotor MLA-130) für 1 h bei 4 °C abgetrennt. Die erhaltenen Solubilisate wurden mittels IMAC aufgereinigt (siehe 2.13).

2.13 Immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC)

Rekombinante Proteine mit einem C- oder N-terminalen Polyhistidin-Tag können über eine immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie aufgereinigt werden. Auf einer Polymermatrix oder metallischen Dynabeads® werden Metallionen wie Nickel oder Kobalt als NTA-Chelatkomplexe immobilisiert. Diese können reversibel mit den Histidin-Seitenketten eines Proteins interagieren (Gaber-Porekar und Menart, 2001). Das gewünschte Protein kann also in einem Aufreinigungsschritt isoliert werden.

Alle in dieser Arbeit hergestellten rekombinanten Membranproteine waren entweder N- oder C-terminal mit einem 6- oder 10-fachen Histidin-Tag fusioniert. Dabei wurde der His-Tag entweder bereits über das Plasmid zur Verfügung gestellt oder er wurde an gewünschter Stelle über Klonierung eingebracht. Die His-Tag Reinigung erfolgte entweder im Durchlauf- bzw. im Batch-Verfahren oder über metallische Dynabeads®.

2.13.1 Durchlauf-Verfahren

Für die Aufreinigung im Durchlauf-Verfahren wurden 5 ml HiTrap™ Chelating HP Säulen verwendet. Die Säulen sind bereits mit chelatisierender Sepharose als Trägermaterial gepackt und können selbst mit den gewünschten Metallionen beladen werden.

In dieser Arbeit wurden die Säulen standardmäßig mit Ni-Ionen geladen. Dafür wurde eine in 20 % (v/v) Ethanol gelagerte Säule mit 3–5 Säulenvolumen (CV) $\text{H}_2\text{O}_{\text{Millipore}}$ gewaschen. Die Beladung erfolgte mit 2,5 ml einer 100 mM NiSO_4 -Lösung. Anschließend wurde die Säule mit 5 CV des jeweiligen Reinigungspuffer (Membranpuffer + 0,1–0,3 % (v/v) Detergenz) äquilibriert. Die Säule konnten nach Benutzung regeneriert und wieder verwendet werden. Dazu wurde sie vor der erneuten Beladung mit Ni-Ionen mit 3–5 CV EDTA (50 mM, pH 7,5) und weiteren 3–5 CV $\text{H}_2\text{O}_{\text{Millipore}}$ gewaschen.

Die Reinigung erfolgte über das ÄKTA Chromatographiesystem mit einer ÄKTA purifier oder einer ÄKTA pure. Beide Systeme waren mit einer UV-Messzelle (280 nm), einer Leitfähigkeitsmesszelle und einem Fraktionssammler ausgestattet und wurden über die Steuerungssoftware UNICORN (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) bedient.

Nach Waschen des Systems mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{Millipore}}$ und Äquilibrierung mit dem jeweiligen Reinigungspuffer konnte die wie oben beschrieben vorbereitete Säule angeschlossen werden. Mit einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml/min wurden die fertigen Solubilisate (siehe 2.12) vollständig auf die Säule aufgetragen. Dies erfolgte unter der Verwendung von 1 % (v/v) Elutionspuffer (Reinigungspuffer + 1 M Imidazol; 1 % $\hat{=}$ 10 mM Imidazol) um unspezifische Bindungen zu verhindern. Der Durchfluss (*flowthrough*, FT) wurde dabei aufgefangen. Im nächsten Schritt wurde die Säule solange mit 20 mM Imidazol (2 % (v/v) Elutionspuffer) gewaschen, bis die Absorption bei 280 nm nicht mehr weiter abnahm. Auch dieser Durchlauf (Wash 1) wurde aufgefangen. Ein zweiter Waschschrift (Wash 2) und die anschließende Elution (E) folgten. Die adäquate Imidazolkonzentration für diese beiden Schritte wurde für jedes Membranprotein separat ermittelt. Dafür wurde zunächst ein Imidazolgradient von 20–500 mM (2–50 % (v/v) Elutionspuffer) Imidazol in 20 ml Gesamtvolumen gefahren. Die Fraktionierung erfolgte zu je 1 ml. Die Säule wurde nach der Elution mit 5 CV 100 % Elutionspuffer ($\hat{=}$ 1 M Imidazol), 10 CV $\text{H}_2\text{O}_{\text{Millipore}}$ und 5–10 CV 20 % (v/v) Ethanol gewaschen und gelagert.

Alle gesammelten Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot (siehe 2.9.2 und 2.9.4) analysiert und die Reinigung somit weiter optimiert.

2.13.2 Batch-Verfahren

Für die Aufreinigung im Batch-Verfahren wurde entweder Ni-NTA-Harz oder TALON (Co-Harz) als Säulenmaterial verwendet. Beide wurden vor Gebrauch mehrfach mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{Millipore}}$ sowie dem jeweils entsprechenden Membranpuffer (siehe 2.11) gewaschen und mit Reinigungsspuffer (Membranpuffer

+ 0,1–0,3 % (v/v) Detergenz) äquilibriert. 20 ml des fertigen Solubilisats (siehe 2.12) wurden zur Bindung an das Säulenmaterial mit diesem vermischt und zuerst für 3 h bei RT, dann bei 4 °C üN inkubiert. Das Ni- bzw. Co-Harz mit dem gebundenen Protein wurde auf eine Säule (10 ml Einmalspritze Soft-Ject® mit Upper Filter) geladen. Das Säulenvolumen für die Aufreinigung betrug 2 ml. Nachdem sich das Säulenmaterial vollständig abgesetzt hatte, wurde zunächst der Durchfluss (Flowthrough) aufgefangen und die Säule dann mit steigenden Imidazolkonzentrationen (5–40 mM) und dem 10-fachen CV gewaschen (Wash 1–4).

Die Elution erfolgte mit 300 mM Imidazol. Das Eluat (E) wurde in Fraktionen zu je 25–30 µl aufgefangen und mittels Bradford-Assay (vgl. 2.9.1.2) auf den qualitativen Proteingehalt hin getestet. Zur Kontrolle des Reinigungserfolges wurden von jedem Schritt Proben entnommen und diese mittels SDS-PAGE und Western Blot (siehe 2.9.2 und 2.9.4) untersucht.

2.13.3 Dynabeads® His-Tag Isolierung

Die His-Tag Aufreinigung mit metallischen Dynabeads® wurde wie vom Hersteller beschrieben durchgeführt mit der Ausnahme, dass die Bindung an die Beads üN bei RT stattfand. Für die Reinigung wurden je 5 ml fertiges Solubilisat (siehe 2.12) eingesetzt.

2.14 Gelfiltrations-Chromatographie

Die Gelfiltrations-Chromatographie, kurz SEC (Size-exclusion chromatography), ist eine Flüssigkeitschromatographie, bei der Moleküle auf Grund ihrer Größe aufgetrennt werden. Da die Matrix der verwendeten Säulen hochporös ist, können große Moleküle schneller passieren und eluieren deshalb früher als kleine Moleküle, welche zunächst in die Säulenmatrix eindringen. Die SEC wurde als zusätzlicher Reinigungsschritt und zur Überprüfung der Homogenität der Proteinprobe durchgeführt.

Eine Superose 6 10/300 GL Säule (24 ml) wurde an das ÄKTA Chromatographiesystem (ÄKTA purifier oder ÄKTA pure) angeschlossen. Die Säulen wurden vor der Gelfiltration mit 2 CV SEC-Puffer (25 mM Tris pH 7,5, 200 mM NaCl, 0,1–0,3 % (v/v) Detergenz) äquilibriert, die Probe (max. 5 mg Protein) über eine Probenschleife (0,5 ml) aufgetragen und die einzelnen Proteine mit einer Flussrate von 0,3 ml/min eluiert. Die Proteinproben wurden vor dem Auftrag auf 0,3–0,5 ml Gesamtvolumen aufkonzentriert (siehe 2.9.1.3) und zusätzlich filtriert (0,2 µm), um das Einbringen störender Schwebeteilchen in das Chromatographiesystem zu verhindern. Das Eluat wurde in Fraktionen zu je 0,5–1 ml aufgefangen und mittels SDS-PAGE und Western Blot (siehe 2.9.2 und 2.9.4) analysiert. Fraktionen, die das gesuchte Zielprotein enthielten, wurden vereinigt und für die Kristallisation vorbereitet. Die Superose 6

10/300 GL Säule wurde nach Gebrauch entsprechend der Herstellerangaben gereinigt und in 20 % (v/v) Ethanol aufbewahrt.

2.15 Proteinkristallisation

Um die Funktion von (Membran-)Proteinen besser verstehen zu können, ist es von großem Nutzen deren Struktur zu kennen. Eine der wichtigsten Methoden zur Ermittlung einer 3D-Struktur mit atomarer Auflösung ist die Analyse von Proteinkristallen durch Röntgenstrahlung. Aus dem dabei entstehenden Diffraktionsmuster kann die Elektronendichte bestimmt und somit eine dreidimensionale Struktur erstellt werden.

Die Proteinkristallisation erfolgte mittels Gasphasendiffusion im „Hanging Drop“-Verfahren. Bei dieser Methode wird zunächst ein Tropfen einer Proteinlösung mit je einem Tropfen Präzipitant (Screening-Lösung/Mutterlösung bzw. Fällungsmittel) gemischt. Der so entstehende Kristallisationstropfen hängt auf einer Platte über einem Reservoir, gefüllt mit dem entsprechenden Fällungsmittel. Da im Reservoir die Konzentration des Fällungsmittels höher ist, kommt es zu einer Diffusion von Wassermolekülen aus dem Kristallisationstropfen. Das Wasser tritt durch die Gasphase in die Reservoirolösung über. Sowohl die Proteinkonzentration als auch die Konzentration des Fällungsmittels im Tropfen erhöhen sich also sukzessive. Durch die langsame Herabsetzung der Löslichkeit des Proteins soll eine spontane Kristallisation herbeigeführt werden.

Alle Screening Experimente wurden halbautomatisch in 96-well Platten unter Verwendung eines Mosquito Pipettierroboters durchgeführt. Um initiale Kristallisationsbedingungen zu ermitteln, wurden Screens der Firma Molecular Dimensions speziell für Membranproteine (MemGold™ HT-96, MemStart/MemSys™), verwendet. Die Reservoirs der 96-well Platten wurden manuell mit je 100 µl der jeweiligen Screening-Lösung befüllt. Die Kristallisationstropfen setzten sich üblicherweise aus 300 nl Proteinlösung (5–10 mg/ml) und 300 nl Screening-Lösung zusammen. Vor der Kristallisation wurden die Proteinproben mit illustra™ NAP-5/NAP-10 Säulen oder PD-10 Säulen nach Herstellerangaben entsalzt und auf ein Gesamtvolumen von 50 µl aufkonzentriert (siehe 2.9.1.3).

Die Kristallisationsplatten wurden bei 18 °C inkubiert und in regelmäßigen Abständen mikroskopisch (Stereomikroskop Leica MDG41) auf Kristallbildung überprüft.

Basierend auf den Ergebnissen der 96-well Screens, wurde je nach Bedarf eine Optimierung der Kristallisationsbedingungen in 24-well Platten durchgeführt. Auch hier wurde eine Gasphasendiffusion im „Hanging Drop“-Verfahren angewendet. Die Reservoirs der 24-well Platte wurden mit je 500 µl verschiedener Kristallisationslösungen befüllt. Die Kristallisationstropfen setzten sich üblicherweise aus 1 µl Kristallisationslösung und 1 µl Proteinlösung (5–10 mg/ml) zusammen. Die Kristallisationsansätze wurden bei 18 °C inkubiert und regelmäßig auf Kristallbildung kontrolliert.

2.16 Tryptophan-Fluoreszenzmessung

Moleküle gehen durch die Absorption von Licht in einen energiereichen angeregten Zustand über. Diese zusätzliche Energie kann danach auf verschiedene Weise wieder abgegeben werden. Eine Möglichkeit besteht in der Strahlungsemission durch Fluoreszenz, wobei Energie in Form von Licht abgegeben wird. Biologische Makromoleküle, wie die aromatischen Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin oder Phenylalanin, weisen eine solche Eigen-Fluoreszenz (intrinsische Fluoreszenz) auf und können daher als Fluorophore für Fluoreszenzuntersuchungen an Proteinen genutzt werden. Wird beispielsweise Tryptophan mit einer Wellenlänge von 280 nm angeregt, erfolgt eine Fluoreszenzemission zwischen 308–350 nm in Abhängigkeit von der Polarität der direkten Umgebung des Tryptophans. Änderungen der direkten Umgebung und/oder Bindung von anderen Molekülen beeinflussen also die Fluoreszenz von Tryptophan und somit können simultan Rückschlüsse auf Konformationsänderungen von Proteinen gezogen werden. Für Bindestudien mit ATP (Magnesiumsalz) wurden 700 µl Proteinlösung (nach Reinigung mittels IMAC und Gelfiltration) mit einer Gesamtproteinkonzentration von circa 100 µg/ml in eine Glasküvette überführt und am Fluoreszenzspektrometer zunächst die Tryptophanfluoreszenz ohne Bindepartner gemessen. Die Anregung erfolgte bei 295 nm, die Emission wurde bei 338 nm aufgezeichnet. Im Abstand von circa 10 min und unter stetiger Detektion der Fluoreszenz, wurde anschließend Mg-ATP (250 mM Stammlösung in SEC-Puffer) in Konzentrationen von 1,0–10,0 mM zugegeben. Als Negativkontrolle wurde die Fluoreszenz des verwendeten Puffers (SEC-Puffer) vor und nach Zugabe von 10 mM Mg-ATP aufgezeichnet. Alle Messungen wurden bei 25 °C durchgeführt. Für jede Substratkonzentration wurden der durchschnittliche Fluoreszenzwert und die jeweilige Standardabweichung ermittelt. Die Fluoreszenzmaxima wurden hinsichtlich der Volumenänderung, bedingt durch Substratzugabe, nach der Formel $F_{max}' = F_{max} \times (V_{final}/V_{initial})$ berechnet. Die Substratkonzentration wurde gegen $\Delta F/F = (F_{max}' - F_{initial}')/F_{initial}'$ aufgetragen.

2.17 Bioinformatische Analysen

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Datenbanken und Programme zur Auswertung von Proteinsequenzen sind im Folgenden aufgeführt:

Datenbank/Server	Referenz
AlignMe	Khafizov <i>et al.</i> , 2010
ClustalW2	Larkin <i>et al.</i> , 2007
Codon Usage Database	http://www.kazusa.or.jp/codon/
ESPrpt	Robert und Gouet, 2014
ExPASy	Gasteiger <i>et al.</i> , 2003

Graphical Codon Usage Analyser	Fuhrmann <i>et al.</i> , 2004
HMMTOP	Tusnady und Simon, 1998
MultAlin	Corpet, 1988
NCBI	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
Pfam	Finn <i>et al.</i> , 2014
Profile Alignment (PRALINE)	Simossis und Heringa, 2005
PSI-BLAST	Altschul <i>et al.</i> , 1997
PyMOL Molecular Graphics System	Schrödinger, LLC
RCSB Protein Data Bank	http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do
TMHMM	Krogh <i>et al.</i> , 2001
Transporter Classification Database (TCDB)	Saier <i>et al.</i> , 2006
TransportDB	Ren <i>et al.</i> , 2004
UCSC Archaeal Genome Browser	Schneider <i>et al.</i> , 2006
XtalPred-RF	Slabinski <i>et al.</i> , 2007

Die oben genannten Programme wurden außerdem dazu benutzt, einen umfangreichen Datensatz für verschiedene annotierte Membranproteine von *I. hospitalis* zu erstellen.

3 Ergebnisse

3.1 Bioinformatische Analysen der Membranproteine von *I. hospitalis*

Mit Hilfe verschiedener bioinformatischer Programme (siehe 2.17) wurde zuerst ein umfangreicher Datensatz zu allen Membranproteinen von *I. hospitalis* mit mindestens 4 und maximal 12 Transmembranhelices erstellt. Er umfasste insgesamt 120 Proteine und enthielt unter anderem Informationen zu vorhergesagten Molekulargewichten (MW), dem Vorhandensein einer Signalsequenz (SS) oder die wahrscheinliche Lage des isoelektrischen Punktes (pI). Zwei als „hypothetisch“ eingestufte Membranproteine (Iho0298 und Iho1012) konnten der Major Facilitator Superfamilie zugeordnet werden. Außerdem wurde ein putativer Chloridkanal, Iho1222 (als hypothetisches Protein eingestuft), identifiziert. Für die heterologe Expression in verschiedenen Systemen wurden geeignete Kandidaten ausgewählt. Neben den acht MFS Transportern sollten auch andere Proteine von *I. hospitalis* untersucht werden, um ein möglichst breites Spektrum für die Expression testen zu können (Tab. 2).

Tabelle 2: Übersicht der vorhergesagten Molekulargewichte (MW), die Anzahl der Transmembranhelices (TMH) und die Länge der Signalpeptide (SP) der heterolog exprimierten Membranproteine von *I. hospitalis*.

Protein	Annotation	MW (in kDa)	TMH	SP (in AS)
Iho0192	Cation Transporter	49,9	9	21
Iho0298	hypothetical Protein NEU: Major Facilitator Superfamily (MFS)	36,6	7	21
Iho0302	Major Facilitator Superfamily (MFS)	37,2	9	---
Iho0391	Major Facilitator Superfamily (MFS)	44,2	12	---
Iho0409	Major Facilitator Superfamily (MFS)	36,1	8	18
Iho0454	Na ⁺ /Solut Symporter	58,0	13	57
Iho0555	Major Facilitator Superfamily (MFS)	37,5	8	---
Iho0573	Amino Acid Permease	46,7	12	---
Iho0800	Major Facilitator Superfamily (MFS)	35,9	7	---
Iho1008	Major Facilitator Superfamily (MFS)	39,0	10	---
Iho1012	hypothetical Protein NEU: Major Facilitator Superfamily (MFS)	36,4	8	---
Iho1083	SNARE associated Golgi Protein	27,4	5	---
Iho1095	Auxin Efflux Carrier	29,2	4	23
Iho1222	hypothetical Protein NEU: Voltage-gated Chloride channel with 2 CBS domains	61,8	9	28

Bei der Auswahl wurde darauf geachtet, dass entsprechende homologe Proteine aus anderen Organismen bereits heterolog exprimiert werden konnten und es bereits gelöste Strukturen gab. Als „hypothetisch“ annotierte Proteine, für die auch nach bioinformatischer Analyse keine Funktion zugeordnet werden konnte, wurden nicht mit einbezogen. Außerdem wurden sowohl Kandidaten mit als auch ohne Signalsequenz ausgesucht.

Für Iho0192, einen putativen Kationentransporter, ergaben sich zwei bakterielle, homologe Strukturen der K⁺-Transporter (Trk) Familie: den Kaliumtransporter TrkH von *Vibrio parahaemolyticus* (3PJZ; Cao *et al.*, 2011) und den Kaliumtransporter KtrAB von *Bacillus subtilis* (4J7C; Vieira-Pires und Morais-Cabral, 2013). Für das als Na⁺/Solut Symporter annotierte Protein Iho0454 konnte der Natrium/Zucker Symporter vSGLT von *V. parahaemolyticus* (3DH4; Faham *et al.*, 2008), welcher zur Familie der Solut:Sodium Symporter (SSS) gehört, als Homolog identifiziert werden. Für Iho0573, vermutlich eine Aminosäure Permease, fanden sich homologe Strukturen in der Aminosäure/Polyamin/Organokation (APC) Superfamilie: zum einen der Arginin/Agmatin Antiporter AdiC von *E. coli* (3LRC; Gao *et al.*, 2009) zum anderen ein Aminosäure Transporter von *Methanocaldococcus jannaschii* (3GIA; Shaffer *et al.*, 2009). Da das hypothetische Protein Iho1222 nach bioinformatischer Analyse als putativer Chloridkanal bestimmt wurde, fanden sich auch homologe Strukturen in der ubiquitären Chlorid Carrier/Kanal (CIC) Familie: der EriC von *E. coli* (1KPK; Dutzler *et al.*, 2002) sowie ein eukaryotischer Chloridkanal von einer Rotalge der Gattung *Rhodophyta* (3ORG; Feng *et al.*, 2010). Für das SNARE assoziierte Golgi Protein Iho1083 wurden nach Sequenzalignments (PSI-BLAST) unter anderem Homologe der DedA Familie aus Gram-positiven Bakterien der Gattung *Bacillus*, *Clostridium* und *Deinococcus* in den Datenbanken ausfindig gemacht. Da dies ebenfalls eine ubiquitäre und hochkonservierte Proteinfamilie ist, wurde Iho1083 für die heterologe Expression ausgewählt, obwohl bisher keine Struktur eines DedA Proteins gelöst werden konnte. Auch für den Auxin Efflux Carrier Iho1095 ließen sich keine gelösten homologen Kristallstrukturen finden. Die Familie der Auxin Efflux Carrier (AEC) ist aber ebenfalls sehr weit verbreitet und ihre Mitglieder kommen in Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien, Cyanobakterien, zahlreichen Archaeen und auch in Pflanzen und Pilzen vor. Bei einem Sequenzalignment zeigten vor allem die bakteriellen Auxin Efflux Carrier der Gattungen *Desulfovibrio*, *Arcobacter* und *Thermocrinis* Ähnlichkeiten zu Iho1095. Die Sequenzalignments einiger genannter Homologe mit den entsprechenden *I. hospitalis* Proteinen sind im Anhang 7E zu finden.

3.2 Heterologe Expression verschiedener Membranproteine von *I. hospitalis*

3.2.1 Heterologe Expression in *E. coli*

Für die heterologe Expression in *E. coli* wurden aus einem bioinformatischen Datensatz 14 verschiedene Membranproteine von *I. hospitalis* ausgewählt (Tab. 2): acht MFS Transporter (Iho0298, Iho0302, Iho0391, Iho0409, Iho0555, Iho0800, Iho1008, Iho1012), ein Kationentransporter (Iho0192), ein Na⁺/Solut Symporter (Iho0454), eine Aminosäure-Permease (Iho0573), ein SNARE assoziiertes Golgi-Protein (Iho1083), ein Auxin Efflux Carrier (Iho1095) sowie ein Chloridkanal (Iho1222).

3.2.1.1 Klonierung

Iho0192, Iho0454, Iho0573, Iho1095 und Iho1222 wurden für die Expression in *E. coli* codonoptimiert und von der Firma Genscript (Genscript USA Inc., Piscataway, USA) im Vektor pET-26b(+) geliefert. Iho1083 wurde in diesem Vektor von der Firma Genart AG (Regensburg) im codonoptimierten Zustand hergestellt.

Der Chloridkanal Iho1222 wurde aber auch ohne vorherige Codonoptimierung, direkt aus genomischer DNA von *I. hospitalis* (freundlicherweise bereitgestellt von Gabi Leichtl, Universität Regensburg) kloniert und in die Plasmide pBAD und pET-26b(+) eingebracht. Da für dieses Membranprotein eine Signalsequenz vorhergesagt wird, wurde für beide Plasmide je ein Konstrukt mit verkürzter Signalsequenz hergestellt.

Alle genannten MFS Transporter wurden ohne Codonoptimierung aus genomischer DNA von *I. hospitalis* kloniert. Iho0298, Iho0302, Iho0409, Iho0800, Iho1008 und Iho1012 wurden in das Plasmid pET-26b(+) eingebracht. Iho0391, Iho0800 und Iho0555 wurden in den Vektor pTTQ18_GFP ligiert.

Das codonoptimierte Konstrukt der Aminosäure-Permease Iho0573 wurde aus dem pET-26b(+) Vektor ausgeschnitten und zusätzlich in einen anderen speziellen Plasmid (pET-28a(+)_MISTIC) kloniert.

Alle selbst hergestellten rekombinanten Plasmide führten zunächst zu positiven Klonen. Allerdings stellte sich nach der Sequenzierung heraus, dass die Klonierung der Konstrukte in den pBAD Vektor nicht erfolgreich war. Alle anderen rekombinanten Plasmide konnten, ebenso wie die codonoptimierten Konstrukte, für die Expression verwendet werden.

3.2.1.2. Expression

Die Expression jedes rekombinant hergestellten Membranproteins wurde in bis zu sieben unterschiedlichen *E. coli* Stämmen getestet (siehe 2.4.1.2). Zusätzlich wurden die Expressionsbedingungen variiert. Es wurden zum Teil zwei verschiedene Expressionsmedien (LB und 2YT) sowie unterschiedliche IPTG Konzentrationen (0,1–1 mM) zur Induktion getestet. Auch der Zeitpunkt der Induktion wurde zwischen einer OD₆₀₀ von 0,6–1,0 variiert. Die Zellen wurden außerdem

bei unterschiedlichem Sauerstoffgehalt gezüchtet. Des Weiteren wurde geprüft, ob die Wachstumstemperatur in Verbindung mit der Wachstumsdauer für die Proteinexpression eine Rolle spielt. Zu diesem Zweck wurden die Kulturen nach der Induktion entweder für 3–5 h bei 37 °C weiter bebrütet oder nach der Induktion auf 20 °C herabgekühlt und üN weiter inkubiert. Die Optimierung der Expressionsbedingungen GFP-getaggtter Konstrukte erfolgte nach ähnlichem Prinzip, jedoch mit kleinen Unterschieden hinsichtlich Temperatur und Wachstumsdauer.

Die Expression der fünf codonoptimierten Membranproteine Iho0192, Iho0454, Iho0573, Iho1095 und Iho1222 wurde in Zusammenarbeit mit Pia Wiegmann (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Christine Ziegler, Universität Regensburg) durchgeführt. In Abbildung 8 ist ein Western Blot nach der Expression gezeigt (Wiegmann, 2013).

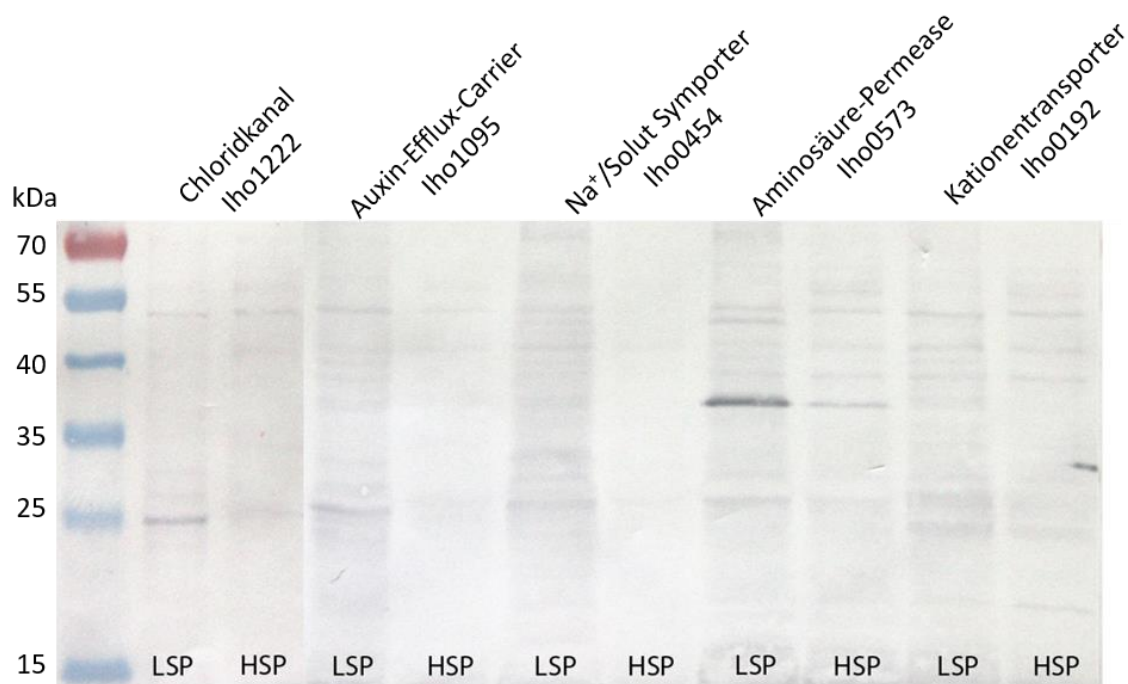


Abbildung 8: Expression der codonoptimierten Membranproteine Iho0192, Iho0454, Iho0573, Iho1095 und Iho1222 in *E. coli* BL21 (DE3). Nach dem Zellaufschluss und der Zentrifugation wurden das Lowspin-Pellet (LSP) und Highspin-Pellet (HSP \triangleq Membranen) im Vergleich aufgetragen; Immunoblot mit Antikörper (poly-His) gegen den C-terminalen 6x Histidin-Tag am Protein (Wiegmann, 2013).

Für keines der Proteine war eine Überexpression nachweisbar. Nur vereinzelt ließen sich schwache Banden, wie zum Beispiel im LSP des Chloridkanals bei circa 25 kDa oder im LSP der Aminosäure-Permease bei etwa 38 kDa, erkennen. Eine MALDI-TOF Analyse der 25 kDa Bande, welche immer wieder nach Expressionen nachgewiesen werden konnte, zeigte, dass es sich dabei um das Vorläuferprotein von OmpA (*outer membrane protein A*) von *E. coli* handelte.

Eine heterologe Expression in *E. coli* war auch für das codonoptimierte Golgi-Protein Iho1083 und die vier nicht-codonoptimierten Varianten des Chloridkanals Iho1222 nicht möglich. Auch die Expression der Aminosäure-Permease Iho0573 in dem speziellen Plasmid pET-28a(+)_MISTIC verlief negativ.

Die Expression der MFS Transporter Iho0298, Iho0302, Iho0409, Iho0800, Iho1008 und Iho1012 in pET-26b(+) führte nur für drei Proteine zu detektierbaren Signalen im Western Blot. Für alle drei Transporter war sowohl im LSP als auch in den Membranen ein deutliches Signal zu erkennen (Abb. 9): für Iho0800 auf Höhe von circa 34 kDa, für Iho0302 bei etwa 28 kDa und für Iho1008 bei 35 kDa. Vor Induktion war nur bei den ersten beiden Proteinen eine schwache Bande detektierbar.

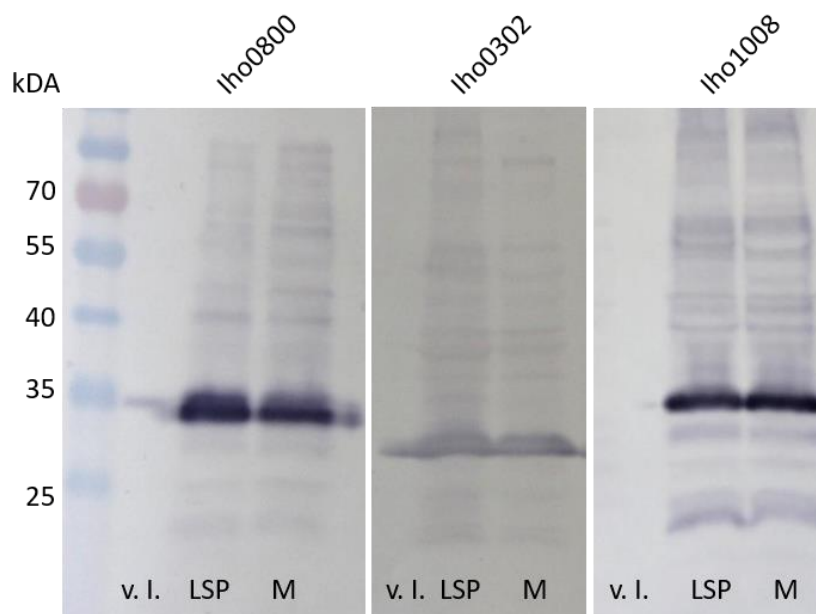


Abbildung 9: Expression der MFS Transporter Iho0800, Iho1008 in *E. coli* Rosetta™ 2 (DE3). Nach dem Zellaufschluss und der Zentrifugation wurden Proben des Lowspin-Pellets (LSP) und des Highspin-Pellets (Membranen, M) im Vergleich zu Proben vor der Induktion (v. l.) aufgetragen; Immunoblot mit Antikörper (poly-His) gegen den C-terminalen 6x Histidin-Tag am Protein.

Diese vermeintlich hohe Überexpression trat jedoch in keiner der Folgeexpressionen nochmals auf und die erzielten Ergebnisse konnten nicht reproduziert werden. Es wurden zwar zum Teil schwache Banden auf adäquater Höhe sichtbar, doch diese waren im Western Blot nur sehr schwach und zudem auch (in gleicher Ausprägung) in den Proben der nicht induzierten Zellen zu sehen. Von einer deutlichen Überexpression konnte also nicht gesprochen werden.

Die MFS Transporter Iho0391, Iho0800 und Iho0555 wurden in den Vektor pTTQ18_GFP ligiert. Durch den GFP-Tag konnte die Optimierung der Expression im *small-scale* Volumen (5 ml) stattfinden (siehe 2.10.1.1.4). Für jeden verwendeten *E. coli* Expressionsstamm wurden 18 verschiedene Expressionsbedingungen getestet. So fand die Expression entweder bei 30 °C oder 37 °C statt, die

Induktion erfolgte mit 0,1, 0,5 oder 1,0 mM IPTG und die Kulturen wurden entweder nach 3 oder 6 h bzw. nach Induktion üN geerntet. Wie bereits beschrieben, wurden nach der Expression Zellaliquots genommen, die Proben auf ein SDS-Gel aufgetragen und die fertigen Gele zur Überprüfung der Fluoreszenz bei 473 nm angeregt. Außerdem wurden die Proben in schwarze 96-well Platten überführt und wiederum ihre Fluoreszenz gemessen.

Für Iho0800 und Iho0555 konnte für keine der getesteten Bedingungen eine Expression festgestellt werden. Die gemessenen GFP-Werte lagen für beide MFS Transporter sogar unterhalb der Werte der Negativkontrollen. Deshalb wurden mit diesen beiden Konstrukten keine weiteren Versuche durchgeführt. Die Ergebnisse für die Expression von Iho0391 sind unter Punkt 3.4.2 zu finden.

3.2.2 Heterologe Expression in *P. furiosus* und *T. kodakarensis*

Für die Expression in dem archaeellen Organismus *P. furiosus* wurde das als Chloridkanal annotierte Membranprotein Iho1222 mit einem vorhergesagten Molekulargewicht von 61,8 kDa, 9 TMHs und einer 28 AS langen Signalsequenz ausgewählt.

In *T. kodakarensis* sollte zunächst der MFS Transporter Iho0298 mit einem voraussichtlichen Molekulargewicht von 36,6 kDa, 7 TMHs und einer Signalsequenz von 21 AS.

Wie bereits beschrieben wurde, verlief die heterologe Expression beider Membranproteine in *E. coli* (siehe 3.2.1.2) erfolglos.

3.2.2.1 Klonierung

Iho1222 wurde zunächst aus genomischer DNA von *I. hospitalis* kloniert und der archaeelle Promotor PF0613, sowie ein 10-facher His-Tag, über eine Fusions-PCR (siehe 2.8.2) an das Gen angebracht. Der His-Tag wurde sowohl C- als auch N-terminal integriert, so dass zwei verschiedene Konstrukte entstanden. Nur das N-terminale Konstrukt konnte erfolgreich in den Shuttlevektor pYS3 eingebracht und in *E. coli* transformiert und vervielfältigt werden. Nach positiver Sequenzierung wurde das rekombinante Plasmid mit N-terminalem His-Tag schließlich in *P. furiosus* eingebracht (siehe 2.10.1.2.1) und die erhaltenen Klone wiederum auf ihre Richtigkeit überprüft. Daraufhin konnte die Expression induziert werden.

Iho0289 wurde für die Expression in *T. kodakarensis* codonoptimiert. Das erhaltene synthetische Gen wurde mit einem Strep-Tag versehen und in einen pUD3 Vektor eingebracht. Das Konstrukt stand unter der Kontrolle des Promotors für ein Cell Surface Glycoprotein Gen (Pcsg) von *T. kodakarensis*. Alle Schritte der Klonierung und Transformation wurden an der Universität Kyoto (Japan) im Labor von Prof. Dr. Haruyuki Atomi durchgeführt. Das Zielgen sollte mittels einer Crossover-Reaktion in das Genom von *T. kodakarensis* eingebracht werden. Nach Aussage von Prof. Dr. Haruyuki Atomi konnten zwar rekombinante Plasmide hergestellt werden, jedoch konnten keine Zellen mit dem integrierten

Gen *iho0298* isoliert werden. Daher konnte die Expression von Iho0298 in *T. kodakarensis* nicht getestet werden. Die Zellen zeigten nach der Crossover-Insertion eine Retardation im Wachstum.

3.2.2.2 Expression

Die Expression von Iho1222 in *P. furiosus* fand zunächst wie beschrieben (siehe 2.10.1.2.2) in 120 ml Serumflaschen statt. Nach Zellaufschluss wurden die präparierten Membranen mit je 2 % (v/v) Triton X-100 sowie DDM solubilisiert, gefolgt von einer His-Tag Reinigung mittels Dynabeads®. Allerdings konnte keine Expression nachgewiesen werden. Da aber generell kaum Banden auf den entsprechenden SDS-Gelen zu sehen waren (hier nicht gezeigt), wurde ein 15 l Fermenter angesetzt, um mehr Zellmasse zu erhalten und eine eventuelle Überexpression von Iho1222 in *P. furiosus* feststellen zu können. Doch auch in diesem Fall konnte keinerlei Überexpression für den putativen Chloridkanal festgestellt werden.

3.3 Analyse des MFS Transporters Tko1655 von *T. kodakarensis*

Da die Expression der MFS Transporter von *I. hospitalis* in *E. coli* bzw. *T. kodakarensis* keinen Erfolg hatte, wurde parallel dazu ein MFS Transporter eines anderen archaeellen Organismus heterolog exprimiert. Die Wahl fiel dabei auf *T. kodakarensis*. Zum einen konnten bereits andere Membranproteine von *T. kodakarensis* erfolgreich in *E. coli* exprimiert und sogar kristallisiert werden (Jensen *et al.*, 2013). Zum anderen ist dieser Organismus genau wie *I. hospitalis* ein strikt anaerobes, hyperthermophiles Archaeum. Durch Sequenzalignments der MFS Proteine von *I. hospitalis* mit dem Genom von *T. kodakarensis*, sollte ein Transporter mit möglichst hoher Sequenzidentität zu den *I. hospitalis* Proteinen gefunden werden. Dabei stellte sich heraus, dass der MFS Transporter Iho0800 und das Protein Tko1655 die größte Ähnlichkeit zueinander aufwiesen (35 %, Alignment siehe Anhang 7E). Bei erfolgreicher Expression des MFS Transporters aus *T. kodakarensis* sollte eine weitere Charakterisierung des Proteins Rückschlüsse auf den homologen MFS Transporter aus *I. hospitalis* geben. Somit sollte es ermöglicht werden, zumindest funktionelle Vorhersagen für Iho0800 anzustellen. Tko1655 ist ebenfalls als MFS Transporter, mit einem Molekulargewicht von 43,5 kDa und 10 TMHs, annotiert. Die erhaltenen Ergebnisse wurden zum Teil bei einem Forschungsaufenthalt an der UCLA (University of California, Los Angeles) im Labor von Prof. Dr. Ronald Kaback erzielt.

3.3.1 Klonierung von Tko1655

Tko1655 wurde aus genomischer DNA von *T. kodakarensis* (freundlicherweise bereitgestellt von Renate Richau, Universität Regensburg) in die drei Vektoren pET26b(+), pBAD und pTTQ18_GFP kloniert. Für das Konstrukt in pBAD konnten keine positiven Klone erzeugt werden. Die anderen beiden

Vektoren lieferten positive Klone und die rekombinanten Plasmide konnten für die Expression genutzt werden.

3.3.2 Heterologe Expression in *E. coli* und Reinigung von Tko1655

Nach einer Testexpression im 100 ml Volumen stellte sich heraus, dass nur für das Konstrukt im pTTQ18_GFP Vektor ein Western Blot Signal detektierbar war (hier nicht gezeigt). Deshalb wurde im Folgenden mit diesem Konstrukt weitergearbeitet.

Durch den GFP-Tag konnte die Optimierung der Expression im *small-scale* Volumen (5 ml) stattfinden (siehe 2.10.1.1.4). Für jeden verwendeten *E. coli* Expressionsstamm wurden 18 verschiedene Expressionsbedingungen getestet. So fand die Expression entweder bei 30 °C oder 37 °C statt, die Induktion erfolgte mit 0,1, 0,5 oder 1,0 mM IPTG und die Kulturen wurden entweder 3 oder 6 h nach Induktion bzw. nach einem Wachstum üN geerntet. Wie bereits beschrieben, wurden nach der Expression Zellaliquots genommen, die Proben auf ein SDS-Gel aufgetragen und die fertigen Gele zur Überprüfung der Fluoreszenz bei 473 nm angeregt. Außerdem wurden die Proben in schwarze 96-well Platten überführt und wiederum die Fluoreszenz gemessen.

Exemplarisch ist eine Fluoreszenzmessung von Tko1655 in den drei *E. coli* Stämmen BL21 (A–B), C43 (C–D) und Rosetta™ 2 (E–F) dargestellt (Tab. 3). Jeder Wert entspricht dabei einer Expressionsbedingung. Außerdem wurde eine PBS-Kontrolle (rot) und je eine nicht-induzierte Negativkontrolle (grün) mitgeführt. Die Signale wurden in der Einheit RFU (*relative fluorescence units*) gemessen.

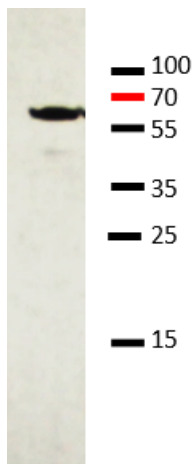
Tabelle 3: 96-well Test zur GFP-basierten Optimierung der Expressionsbedingungen für Tko1655. Jeder Wert (Einheit RFU) entspricht einer Expressionsbedingung; Stämmen BL21 (A–B), C43 (C–D) und Rosetta™ 2 (E–F); rot = PBS-Kontrolle; grün = Negativkontrolle.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	5	1768	7563	7316	7361	9970	8995	11136	17598	17199	17940	15942
B	17168	14339	41638	43201	41902	34322	36893	34112				
C	2348	7598	6644	7402	9846	10270	10614	13456	13577	13229	16865	17771
D	17990	31027	32468	30992	31401	33634	32077					
E	2476	6170	6040	5361	5717	6580	5823	6462	7423	7494	6127	7336
F	7970	12092	12318	11248	13505	13706	13803					

Die höchsten Werte wurden für BL21 (Bedingung B4: 43201) und C43 (Bedingung D6: 33634) gemessen. Dies entspricht für BL21 einem Wachstum bei 37 °C, einer Induktion mit 0,5 mM IPTG und einer Ernte 6 h nach der Induktion. Für C43 lieferte ein Wachstum bei 37 °C, eine Induktion mit 0,5 mM IPTG und eine Inkubation der Zellen üN mit anschließender Ernte den höchsten Wert. Die

Fluoreszenzsignale eines SDS-Gels mit Proben der ganzen *E. coli* Zellen (hier nicht gezeigt) bestätigten diese Tendenz.

Tko1655 wurde unter den genannten Expressionsbedingungen in BL21 in einem größeren Maßstab (10 l) kultiviert, um zu sehen, ob eine Hochskalierung des Expressionsvolumen möglich war und sich das Protein auch in den präparierten Membranen nachweisen ließ. Nach Expression von Iho0391 in einem Gesamtvolumen von 10 l konnte auch in den präparierten Membranen ein Signal oberhalb der 55 kDa Markierung im Western Blot detektiert werden (Abb. 10). Das errechnete apparente Molekulargewicht von Tko1655 liegt bei 43,5 kDa, GFP besitzt eine Größe von ungefähr 27 kDa. Zusammen sollten beide Proteine also eine Größe von circa 70 kDa aufweisen. Das hier nachgewiesene Signal lag etwas unterhalb dieser Erwartung. Das ist aber gerade für Membranproteine nicht ungewöhnlich. Häufig laufen sie in einer SDS-PAGE nicht gemäß ihrem errechneten Molekulargewicht. Membranproteine diffundieren im Gel meist schneller und erscheinen deshalb auf einer niedrigeren Höhe. Dieses Laufverhalten wird auch als „Gel shifting“ bezeichnet und stellt ein bekanntes Phänomen für Membranproteine dar (Rath *et al.*, 2009). Membranproteine binden im Vergleich zu löslichen Proteinen mehr SDS, da die Detergenzmoleküle an den hydrophoben Residuen im Protein aggregieren. SDS denaturiert nicht nur die Sekundär- und Tertiärstrukturen, sondern sorgt außerdem für eine negative Ladung der Proteine, so dass diese als Anionen im Gel wandern (Shapiro *et al.*, 1976). Die Bindekapazität von SDS scheint also der bestimmende Faktor für abweichende Migration in SDS-Gelen zu sein.



Für den Expressionsansatz wurde eine Gesamtproteinmenge von 35 mg/ml (Membranen, 15 ml) ermittelt und die Zellen hatten bei der Ernte eine OD_{600} von 2,1 erreicht.

Abbildung 10: Nachweis der Expression von Tko1655 in Membranen von *E. coli*. Expression in BL21 Zellen (Expressionsbedingung: 10 l LB Medium, 37 °C, 0,5 mM IPTG, Ernte 6 h nach Induktion); Immunoblots mit Antikörper gegen den C-terminalen 10x Histidin-Tag am Protein.

Vor einer His-Tag basierten Reinigung von Tko1655 wurde zunächst ein Detergenz Screen durchgeführt (Abb. 11). DDM und DM waren als Detergenz zwar etwas besser geeignet als NM, aber insgesamt betrachtet lieferten UDM und Fos-Cholin 12 das beste Solubilisierungsergebnis. Die Effizienz lag bei etwa 70 %. Für eine Reinigung im Batch-Verfahren mit TALON wurde UDM ausgewählt.

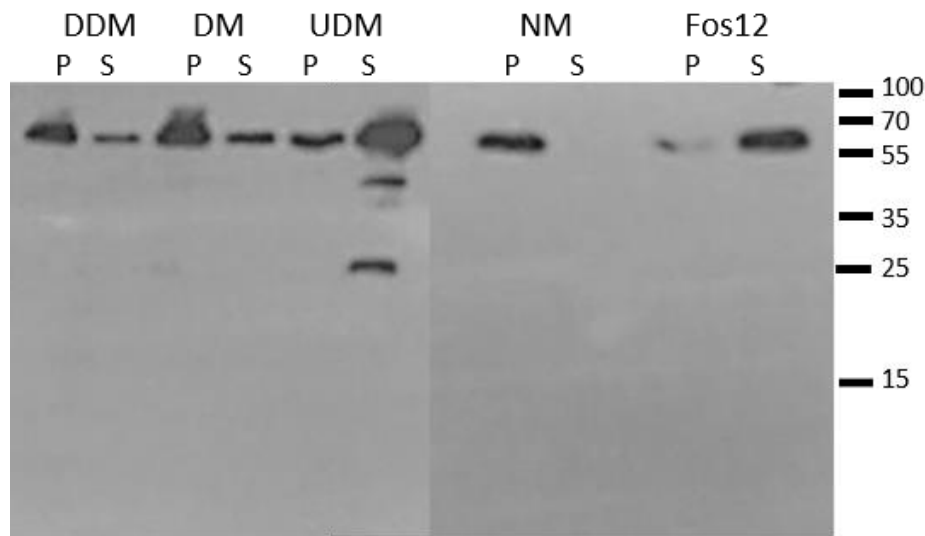


Abbildung 11: Solubilisierung von Tko1655 mit verschiedenen Detergenzien. Solubilisierung mit je 1,67 % Detergenz für 1 h bei RT. Im Vergleich wurden Pellet (P) und Solubilisat (S) nach der Ultrazentrifugation aufgetragen; Immunoblot mit Antikörper gegen den C-terminalen 10x Histidin-Tag am Protein.

Nach einstündiger Solubilisierung mit 2 % (v/v) UDM bei RT in einem Gesamtvolumen von 20 ml wurde die Probe auf eine Säule mit TALON-Resin aufgetragen. Es folgte ein Waschschriff mit 15 mM Imidazol, die Elution verlief bei einer Imidazolkonzentration von 200 mM. Der Reinigungspuffer enthielt 0,1 % (v/v) UDM. An die Säule konnte nicht das gesamte Zielprotein gebunden werden, da im Durchfluss eine schwache Bande oberhalb der 55 kDa Markierung zu erkennen war (Abb. 12 A und B).

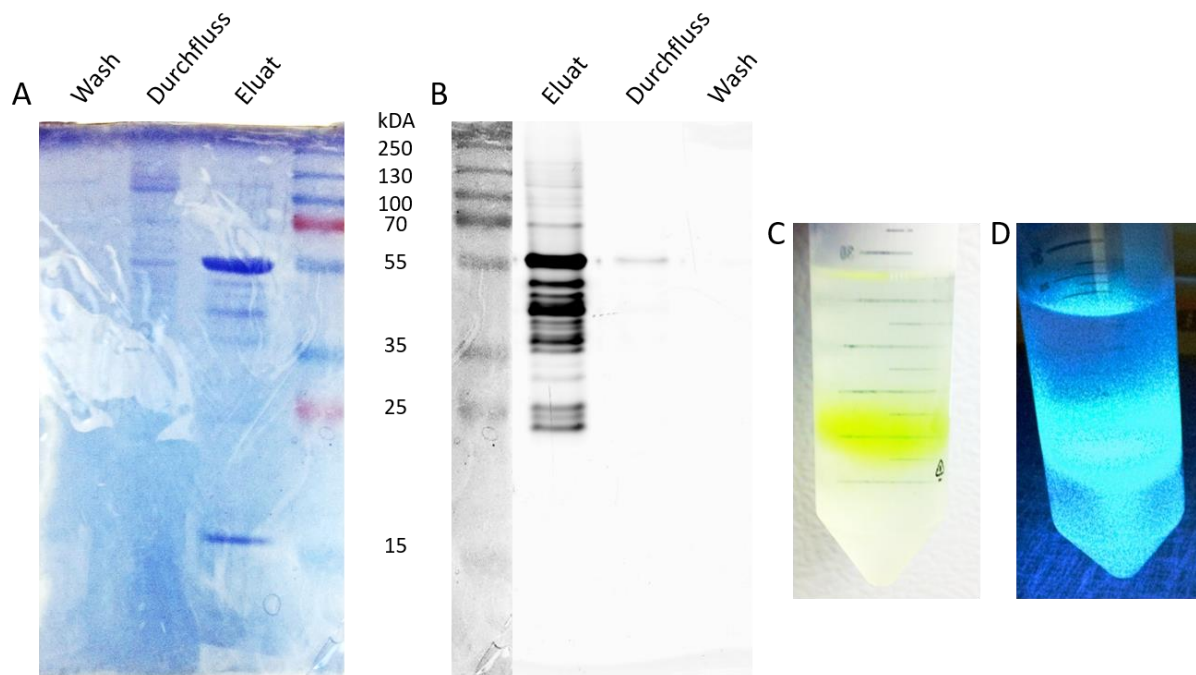


Abbildung 12: IMAC von Tko1655 im Batch-Verfahren mit TALON. Die Solubilisierung erfolgte für 1 h bei RT mit 2 % (v/v) UDM, der Waschschriff (Wash) erfolgte mit 15 mM Imidazol, die Elution mit 200 mM Imidazol, außerdem ist der Durchfluss aufgetragen. (A) Coomassie-Färbung, (B) Anregung des C-terminalen GFP-Tags am Protein, (C) GFP-Fluoreszenz des Eluats bei Tageslicht, (D) GFP-Fluoreszenz des Eluats nach Anregung mit UV-Licht.

Die GFP-Fluoreszenz lieferte jedoch eindeutig im Eluat die meisten und stärksten Signale. Wiederum war oberhalb der 55 kDa das erwartete Signal von Tko1655 zu sehen. Allerdings waren zwischen 25 und 55 kDa zahlreiche weitere fluoreszierende Banden verteilt. Im Wash hingegen waren kaum Proteinbanden vorhanden. Auch bei Betrachtung der Eluatfraktion bei Tageslicht sowie nach Anregung mit UV-Licht war bereits mit bloßem Auge die GFP-Fluoreszenz zu erkennen (Abb. 12 C und D). Wie schon für das im selben Plasmid exprimierte Expressionsprodukt von Iho0391 waren im Eluat nach der His-Tag basierten Reinigung zahlreiche Abbaubanden zu sehen. Die Reinigung von Tko1655 wurde jedoch nur einmal mit UDM durchgeführt. Auch im Solubilisierungstest (Abb. 11) waren im Vergleich zu den anderen Detergenzien für UDM Abbaubanden im Solubilisat sichtbar. Aus diesem Grund sollte die Reinigung in der Bachelorarbeit von Kristina Plobner reproduziert und optimiert werden. Allerdings traten schon bei der Expression von Tko1655 Schwierigkeiten auf, weshalb die Versuche nicht reproduziert und weiter entwickelt wurden (Plobner, 2014).

3.4 Analyse des MFS Transporters Iho0391 von *I. hospitalis*

3.4.1 Erstellung eines Homologiemodells

Unter Verwendung der „Mix & Match“ Methode (Madej *et al.*, 2013 und Madej und Kaback, 2013) wurde ein Homologiemodell des MFS Transporters Iho0391 erstellt (Nisha Sharma, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Christine Ziegler, Universität Regensburg). Trotz funktioneller und struktureller Ähnlichkeiten weisen die Mitglieder der Major Facilitator Superfamilie untereinander nur geringe Sequenzidentitäten auf. Die „Mix & Match“ Methode berücksichtigt bei der Analyse von MFS Transportern deren evolutionäre Entwicklung und durch die Neuordnung struktureller Symmetrie-Motive lassen sich bemerkenswert hohe Homologien feststellen. Der für MFS Proteine typische MFS-Fold ermöglicht es, die Transporter in vier funktionelle Einheiten mit je drei TMHs einzuteilen. Werden die Untereinheiten eines MFS Proteins getrennt voneinander betrachtet und mit den Untereinheiten anderer Transporter der Superfamilie verglichen, können signifikante Ähnlichkeiten, wie z.B. die Position konservierter Aminosäurereste, erfasst werden. Auch Iho0391 wurde in vier Triplets aufgeteilt (A–D) und diese unabhängig voneinander untersucht.

Als Grundlage für das resultierende Homologiemodell (Abb. 13 A) dienten angesichts entsprechender Sequenzidentitäten zwei Proteine der Major Facilitator Superfamilie aus *E. coli*. Zum einen wurde der Transporter YajR (3WDO; Jiang *et al.*, 2013), vermutlich ein Antiporter, zum anderen FucP (3O7Q; Dang *et al.*, 2010), ein Fucose/H⁺ Symporter, verwendet. Triplett A und B von Iho0391 wurden mit den Triplets C und D von YajR verglichen und hatten eine Sequenzidentität von 22 %. Triplett C und D von Iho0391 wurde mit den Triplets A und B von FucP aligniert und wiesen eine Sequenzidentität von 19 %

auf. Die genauen Parameter zur Erstellung des Modells sowie dessen detaillierte Beschreibung sind Teil der laufenden Masterarbeit von Nisha Sharma.

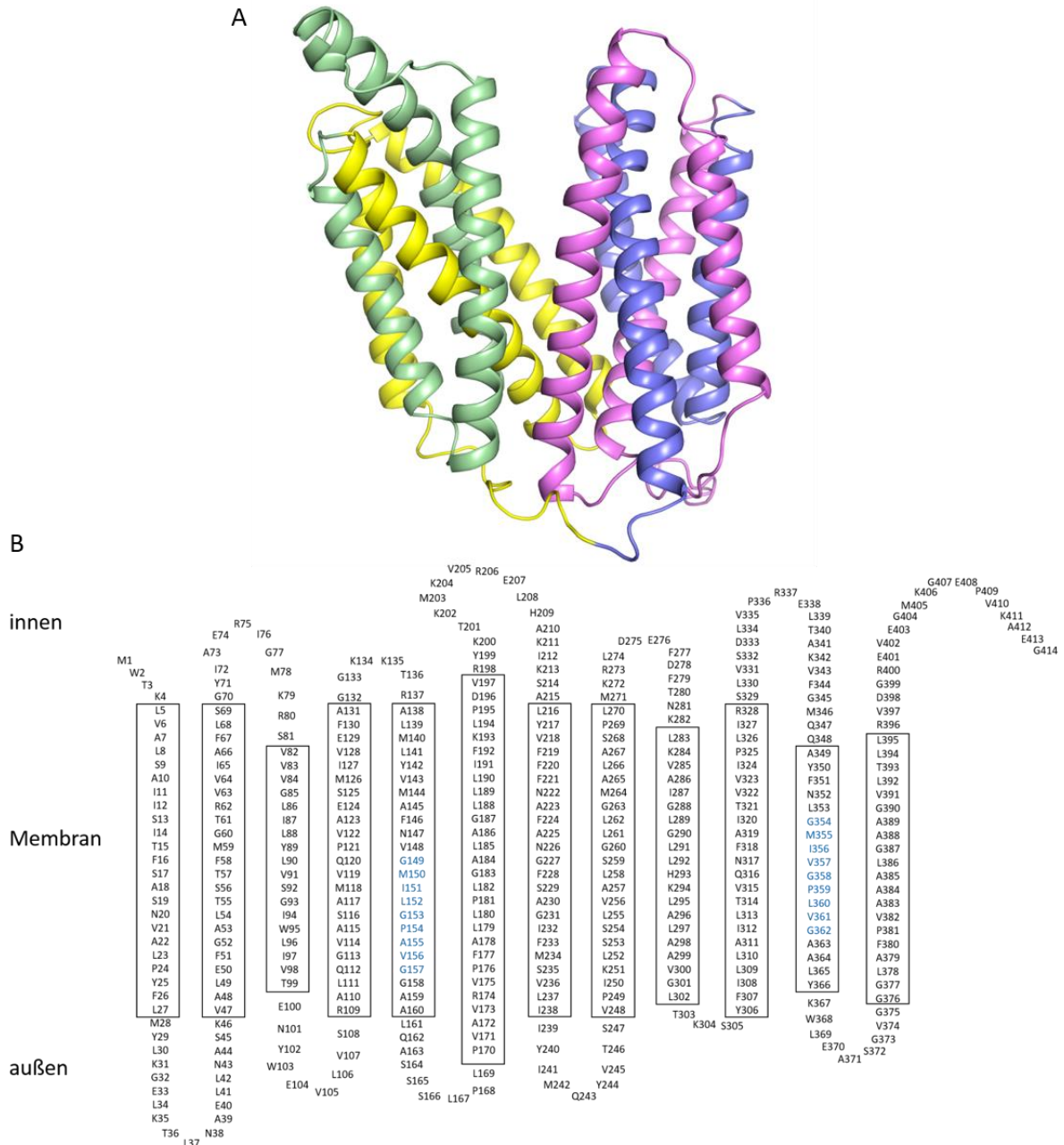


Abbildung 13: Homologie- und Topologiemodell von Iho0391. (A) Ribbon-Diagramm des Monomers in der Seitenansicht; Triplet A (grün), Triplet B (gelb), Triplet C (blau), Triplet D (violett); (Modell: Nisha Sharma), (B) Topologie-Modell von Iho0391, TMH (1–12) sind durch schwarze Kästen angezeigt, das Antiporter-Motiv ist in blau markiert.

Der typische MFS-Fold wird in Iho0391 von 12 TMH ausgebildet, die durch eher hydrophile Loops miteinander verbunden sind. Sowohl der C- als auch der N-Terminus liegen auf der inneren Seite. Die beiden pseudosymmetrischen Domänen die aus je 6 TMH gebildet werden sind V-förmig angeordnet. Dazwischen wird die Substratbindestelle aufgespannt. Triplet A besteht aus den Aminosäuren M1–

N101, Triplet B reicht von Y102–R206. Triplet C und D umfassen die Aminosäuren E207–T303 bzw. K304–G414. Antiporter der MFS Familie weisen in der fünften TMH ein konserviertes Motiv *GXXXGPXXG*, das sogenannte Antiporter-Motiv, auf (Paulsen *et al.*, 1996). Auch für Iho0391 konnte dieses Motiv in der fünften und der elften TMH identifiziert werden (blaue Markierung Abb. 13 B).

Da es die Hypothese gibt, dass Mitglieder der Major Facilitator Superfamilie entfernt zur Familie der ATP/ADP Antiporter verwandt sind, rief das identifizierte Antiporter-Motiv Assoziationen zu einer möglichen ATP/ADP Transportfunktion von Iho0391 hervor. Diese Fragestellung wurde deshalb sowohl experimentell (SEC Analyse mit Mg-ATP, siehe 3.4.3.3) als auch bioinformatisch eruiert. Für letztere Analysen wurden Docking-Experimente durchgeführt. Die Methode findet vor allem in der Pharmaforschung breite Anwendung, da es möglich ist, Liganden in eine Bindungsstelle einzubringen, um mögliche Interaktionen zu betrachten. Für die Untersuchung einer möglichen Bindung zwischen Iho0391 und ATP wurde das Programm AutoDock verwendet. Die Analysen wurden ebenfalls von Nisha Sharma und Dr. Silvia de Sanctis (Universität Regensburg) durchgeführt. Das ATP-Molekül wurde dabei in die vermeintliche Substratbindestelle eingefügt (Abb. 14 A). Ist eine Interaktion von Substrat und Protein theoretisch möglich, stellt das Programm alle potentiellen Konformationen dar. Außerdem wird dabei ein Affinitätswert (kcal/mol) ermittelt, welcher die Energie, die für die Bindung des Liganden in der jeweiligen Konformation benötigt wird, beschreibt. Je niedriger dieser Wert, desto besser ist die entsprechende Anordnung des Liganden in der Bindetasche. Für Iho0391 und ATP konnten tatsächlich mehrere mögliche Konformationen gefunden werden. In der Konformation mit dem niedrigsten Affinitätswert steht das ATP-Molekül mit 12 Aminosäureresten in Verbindung (Abb. 14 B).

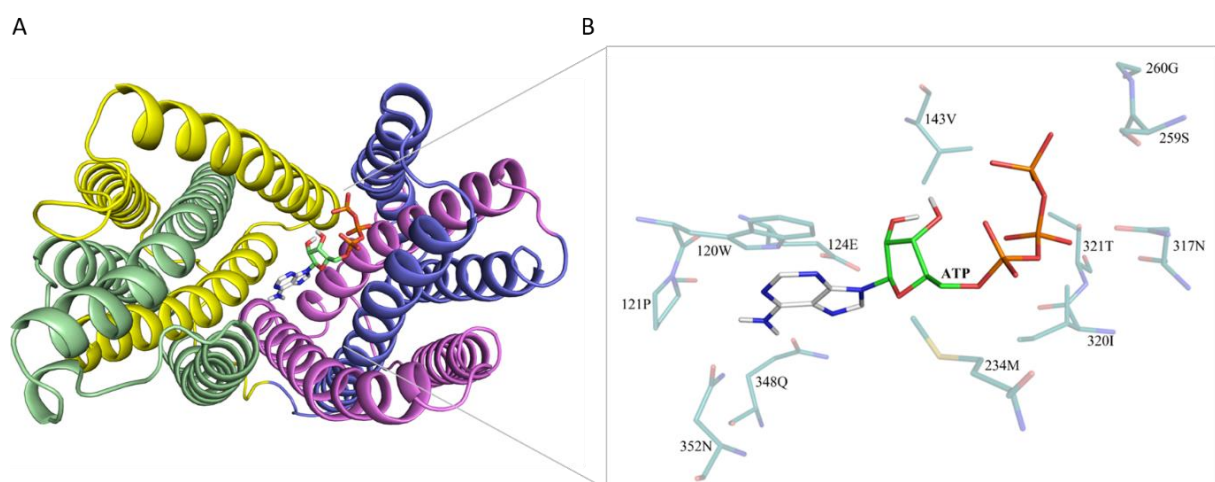


Abbildung 14: Docking Experiment mit Iho0391 und ATP. (A) Ribbon-Diagramm des Monomers von Iho0391 (Aufsicht) mit ATP in der vorhergesagten Bindetasche, (B) Abbildung der Bindetasche von Iho0391. Das ATP-Molekül und die interagierenden Aminosäurereste sind in Stäbchen-Form dargestellt. (Docking Experimente: Nisha Sharma und Silvia de Sanctis).

Da unter anderem auch ein Tryptophanrest (Trp120) in die Bindung von ATP involviert ist, konnte diese Aminosäure für intrinsische Fluoreszenzmessungen verwendet werden (Tryptophan-Fluoreszenzmessung mit Mg-ATP, siehe 3.4.3.3).

3.4.2 Heterologe Expression in *E. coli* und Reinigung von Iho0391

Iho0391 wurde für die heterologe Expression in *E. coli* in den Vektor pTTQ18_GFP ligiert. Durch den GFP-Tag konnte die Optimierung der Expression im *small-scale* Volumen (5 ml) stattfinden (siehe 2.10.1.1.4). Für jeden verwendeten *E. coli* Expressionsstamm wurden 18 verschiedene Expressionsbedingungen getestet. So fand die Expression entweder bei 30 °C oder 37 °C statt, die Induktion erfolgte mit 0,1, 0,5 oder 1,0 mM IPTG und die Kulturen wurden entweder nach 3 oder 6 h bzw. nach Induktion üN geerntet. Wie bereits beschrieben, wurden nach der Expression Zellaliquots genommen, die Proben auf ein SDS-Gel aufgetragen und die fertigen Gele zur Überprüfung der Fluoreszenz bei 473 nm angeregt. Außerdem wurden die Proben in schwarze 96-well Platten überführt und wiederum ihre Fluoreszenz gemessen.

Exemplarisch ist eine Fluoreszenzmessung von Iho0391 in den vier *E. coli* Stämmen Rosetta™ 2 (A–B), BL21 pLysS (C–D), BL21 (E–F) und C43 (G–H) dargestellt (Tab. 4). Jeder Wert entspricht dabei einer Expressionsbedingung. Außerdem wurde eine PBS-Kontrolle (rot) und je eine nicht-induzierte Negativkontrolle (grün) mitgeführt. Die Signale wurden in der Einheit RFU (*relative fluorescence units*) gemessen.

Tabelle 4: 96-well Test zur GFP-basierten Optimierung der Expressionsbedingungen für Iho0391. Jeder Wert (Einheit RFU) entspricht einer Expressionsbedingung; *E. coli* Stämme Rosetta™ 2 (A–B), BL21 pLysS (C–D), BL21 (E–F) und C43 (G–H); rot = PBS-Kontrolle; grün = Negativkontrolle.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	4	772	1070	1269	1234	1237	1231	1343	1109	1811	1493	1125
B	1229	1304	1400	1543	1536	1341	1327	1358				
C	1967	3061	7416	10869	10249	11554	14783	12845	17205	10462	11690	13337
D	11699	12877	11011	7436	6951	7204	7356					
E	2348	7464	9296	12092	13313	13310	17144	17412	28760	22933	20092	27387
F	20631	27785	36123	35744	27564	19830	24309					
G	2476	6940	9970	10720	10319	14672	15668	3629	17763	23541	16543	19873
H	22958	32148	42307	36661	17820	32411	38075					

Die höchsten Werte wurden für BL21 (Bedingung 3F: 36123 RFU) und C43 (Bedingung 3H: 42307 RFU) gemessen. Dies entsprach in beiden Fällen einem Wachstum bei 37 °C, einer Induktion mit 0,5 mM IPTG und einer Ernte 6 h nach der Induktion. Die Fluoreszenzsignale eines SDS-Gels mit Proben der ganzen *E. coli* Zellen (hier nicht gezeigt) bestätigten die Tendenz. Deshalb wurde Iho0391 unter den genannten Expressionsbedingungen in beiden Stämmen nochmals in einem größeren Maßstab (je 1 l)

kultiviert, um zu sehen, ob eine Hochskalierung des Expressionsvolumen möglich war und sich das Protein auch in den präparierten Membranen nachweisen ließ.

Nach Expression von Iho0391 im 1 l Maßstab konnten auch in den Membranen der beiden *E. coli* Stämme Fluoreszenzsignale nachgewiesen werden (Abb. 15). Neben diversen schwächeren Banden zwischen 150 und 25 kDa waren zwei dominante Banden zu erkennen: auf Höhe von etwa 55 kDa sowie bei circa 40 kDa. Die errechnete Größe von Iho0391 liegt bei 44,2 kDa, GFP ist ungefähr 27 kDa groß. Zusammen sollten beide Proteine daher eine Größe von rund 71 kDa aufweisen. Die hier aufgetretenen markanten Signale lagen etwas unterhalb dieser Erwartung. Die Abweichung kann aber wiederum durch die hydrophoben Eigenschaften von Membranproteinen und der damit verbundenen veränderten Bindekapazität für SDS erklärt werden. Für beide Expressionsansätze (je 1 l) wurde eine Gesamtproteinmenge von 3 mg/ml ermittelt (Membranen, je 5 ml) und die Zellen wiesen bei der Ernte eine OD₆₀₀ von 1,6 auf. Da die Signale für den *E. coli* Stamm BL21 insgesamt etwas stärker waren, wurde mit diesem Stamm weitergearbeitet.

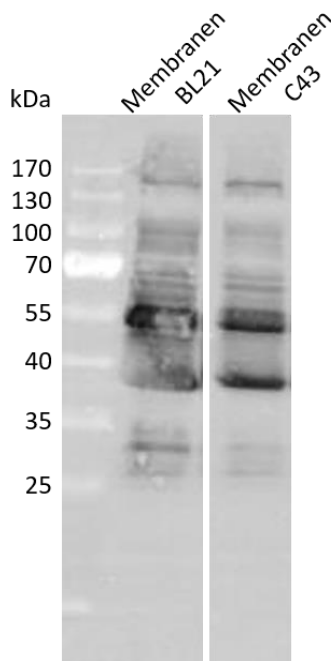


Abbildung 15: Präparierte Membranen von *E. coli* BL21 und C43 nach Expression von Iho0391. Nach dem Zellaufschluss und der Zentrifugation wurden die Membranen von beiden Expressionsansätzen (je 1 l, 37 °C, 0,5 mM IPTG, Ernte 6 h nach Induktion) auf ein SDS-Gel aufgetragen und die Proteine mittels Western Blot auf eine PVDF Membran übertragen; Anregung des C-terminalen GFP-Tags am Protein.

In nachfolgenden Experimenten sollte versucht werden Iho0391 mittels IMAC zu reinigen. Um die Solubilisierungseffizienz verschiedener Detergenzien vergleichen zu können, wurde zunächst ein Detergenz Screen im kleinen Maßstab durchgeführt (siehe 2.12). Das Solubilisat sowie das Pellet nach der Ultrazentrifugation (Abb. 16 A) wurden in einer SDS-PAGE und im Western Blot analysiert (hier nicht gezeigt). Da mit beiden Methoden jedoch keine eindeutige Aussage zur Solubilisierungseffizienz getroffen werden konnte, wurden je 200 µl des jeweiligen Solubilisats in einer schwarzen 96-well Platte angeregt und die Fluoreszenz des GFP-Tags in RFU gemessen (Abb. 16 B).

Wie schon rein optisch zu erkennen, solubilisierten die nichtionischen Glykoside OG und NG nur halb so effizient wie die anderen Detergenzien. Die Pellets nach dem Solubilisieren waren in diesen Proben noch grün gefärbt, wohingegen die Pellets der anderen Solubilisierungsansätze nahezu farblos waren. Nach Messung der Fluoreszenz des GFP-Tags lieferten DDM und Fos-Choline-14 die höchsten Werte. Für die Reinigung mittels IMAC wurde schließlich DDM als Detergenz ausgewählt.

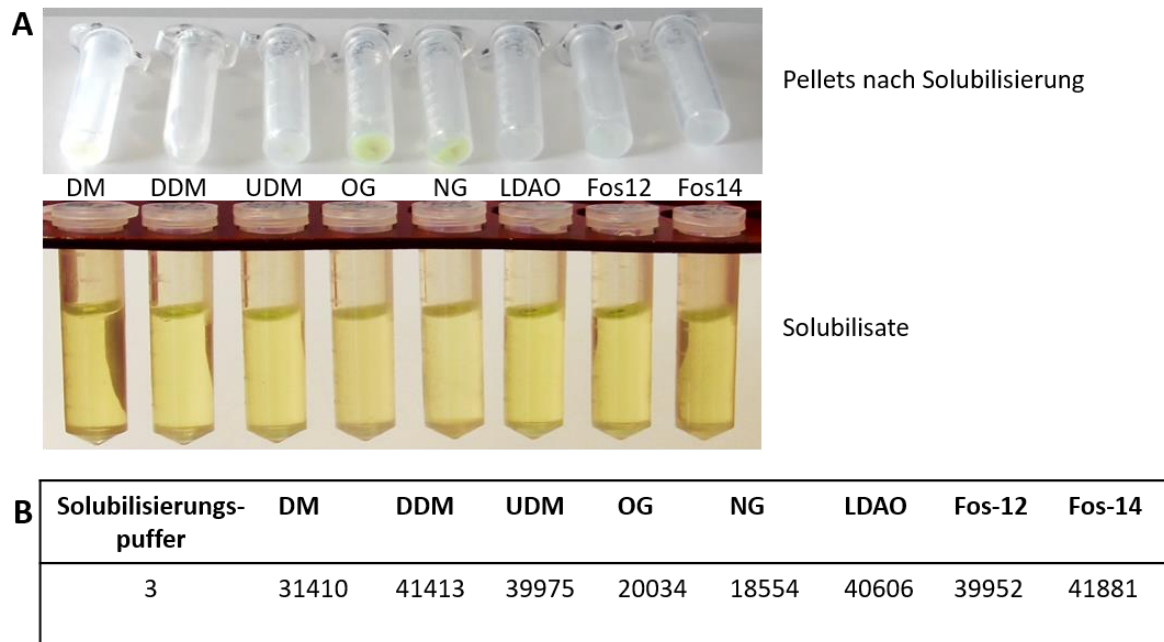


Abbildung 16: Solubilisierung von Iho0391 mit verschiedenen Detergenzien. Solubilisierung mit je 1,67 % Detergenz für 1 h bei RT. (A) Solubilisate und Pellets nach der Solubilisierung, (B) Ergebnisse der GFP-Messung für die verschiedenen Solubilisate (Einheit RFU).

Die His-Tag basierte Reinigung erfolgte sowohl im Batch-Verfahren mit Ni-NTA und TALON als auch mit Hilfe von Dynabeads® (siehe 2.13.2 und 2.13.3). Abbildung 17 zeigt eine IMAC, die mit metallischen Beads durchgeführt wurde. Sowohl der fluoreszente Nachweis des GFP-Tags als auch der Western Blot gegen den C-terminalen His-Tag wiesen ein starkes Signal auf Höhe von circa 55 kDa auf. Diese Bande war im Durchfluss und im ersten Waschschrift (Wash 1, 15 mM Imidazol) zu finden und wurde in der eluierten Probe angereichert. Durch die Anregung des GFP-Tags (Abb. 17 A) zeigten sich vor allem im Eluat weitere Signale bei 34 und 27 kDa. Diese waren auch auf dem Western Blot gegen den C-terminalen His-Tag (Abb. 17 B) zu finden. Im Western Blot zeigte sich im Eluat aber auch noch eine weitere starke Bande bei 40 kDa. Die Reinigung von Iho0391 im Batch-Verfahren mit Ni-NTA und TALON (hier nicht gezeigt) lieferte die gleichen Resultate bzw. zeigten sich im Bereich von 55-20 kDa sogar noch zusätzliche Signale. Es wurde mit vier verschiedenen Imidazolkonzentrationen gewaschen (5, 10, 20 und 40 mM). Die Elution erfolgte ebenfalls mit 300 mM Imidazol.

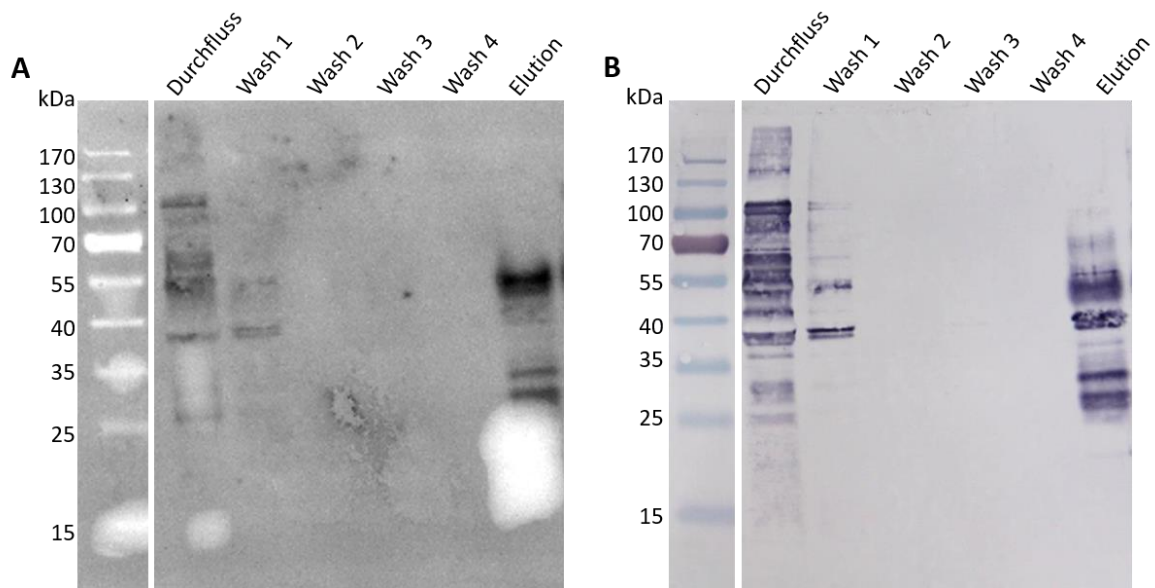


Abbildung 17: Aufreinigung von Iho0391 nach Solubilisierung mit DDM über Dynabeads®. Die Solubilisierung erfolgte für 1 h bei RT mit 2 % (v/v) DDM, Waschschrte (Wash 1–4) mit je 15 mM Imidazol, die Elution mit 300 mM Imidazol, außerdem ist der Durchfluss aufgetragen. (A) Anregung des C-terminalen GFP-Tags am Protein, (B) Immunoblot mit Antikörper gegen den C-terminalen 10x Histidin-Tag am Protein.

Der Grund für das Auftreten von zusätzlichen Banden mit niedrigerem Molekulargewicht könnte in einem proteolytischen Abbau liegen. Proteasen bzw. Peptidasen sind ubiquitär sowohl in Eukaryoten als auch in Prokaryoten zu finden und dienen dem Abbau von Proteinen, da sie die Hydrolyse von Peptidbindungen katalysieren. Neben der Prozessierung von Präkursor-Proteinen und der Abspaltung von Signalsequenzen für das korrekte Targeting von Proteinen, regulieren Proteasen den Proteinhaushalt. Die Beseitigung fehlerhafter Proteine, welche oft missgefaltet werden und aggregieren können, zählt dabei ebenso zu den Aufgaben der Proteasen wie die Degradation von regulatorischen Enzymen, die nur zeitlich begrenzt benötigt werden (Gottesman, 1996). Aber nicht nur zelleigene Proteine sondern auch Fremdproteine, z.B. von Viren, werden proteolytisch abgebaut, um die Zelle zu schützen. In *E. coli* werden unter Stressbedingungen (z.B. bei Hitzeschock) vermehrt Proteasen induziert, die beschädigte Proteine entfernen. Auch rekombinante Proteine werden nach Expression in *E. coli* häufig proteolytisch abgebaut, da sie oft nicht korrekt gefaltet werden und sich außerdem in großen Mengen in den Zellen anhäufen können (Goldberg, 2003). Es könnte also durchaus sein, dass Iho0391 zum Teil durch Proteasen angegriffen wurde, weil in zu kurzer Zeit zu viel Protein angehäuft wurde und *E. coli* nicht das gesamte synthetisierte Protein in die Membran einbauen bzw. korrekt falten konnte. Die Expression wurde zwar unter Berücksichtigung der Stärke der GFP Fluoreszenz optimiert, doch optimale Bedingungen hinsichtlich Wachstum und Expressionsstärke bedeuten nicht zwangsläufig auch optimale Bedingungen für die Prozessierung und somit die Qualität des Proteins. Untersucht man die Proteinsequenz von Iho0391 mit dem Programm PeptideCutter des Portals ExPASy ergeben sich für 21 der insgesamt 37 getesteten Proteasen mögliche Schnittstellen. Zur

Vermeidung von Denaturierung oder Proteolyse beim Zellaufschluss und der Membrapräparation wurde bei 4 °C und in Anwesenheit von Proteaseinhibitoren gearbeitet.

Alle prominenten Banden, die nach Reinigung von Iho0391 im Eluat auftraten, wurden ausgeschnitten und mittels MALDI-TOF analysiert. Wie sich dabei herausstellte, konnte für jede der untersuchten Banden nur GFP identifiziert werden. Proteine von *I. hospitalis* konnten in keiner der Proben nachgewiesen werden. Da der Verdau für die Analyse mit Trypsin erfolgte, wurde überprüft, ob für dieses Enzym auch Schnittstellen vorhanden sind. Es gibt insgesamt 36 Trypsin Schnittstellen in Iho0391, die das Protein in geeignete Peptide für die Analyse zerlegen.

Dass aber eine Überexpression von Iho0391 stattgefunden hat, steht außer Frage, da nachweislich GFP gebildet wurde. Wenn das grün fluoreszierende Protein GFP C-terminal an Membranproteine fusioniert wird, fungiert es als Indikator für die stabile Faltung des Zielproteins. Denn nur wenn das Membranprotein exprimiert, korrekt gefaltet und in die Membran des Expressionswirt integriert wird, wird auch das GFP richtig gefaltet und kann fluoreszieren (Drew *et al.*, 2006). In einer Studie von Geertsma *et al.* (2008) wurde festgestellt, dass durch GFP Fusionen sogar eine Quantifizierung von gefaltetem und aggregiertem Protein vorgenommen werden kann. Grund ist das unterschiedliche Laufverhalten von korrekt und nicht korrekt gefaltetem GFP in SDS-Gelen. Für die in *E. coli* exprimierten Fusionsproteine (verschiedene Membranproteine + GFP) konnten im Gel über einen zusätzlich vorhanden His-Tag Doppelbanden nachgewiesen werden. Die jeweils untere Bande konnte über ihre GFP Fluoreszenz dem korrekt gefalteten Zielprotein zugeordnet werden. Die obere Bande war nur mittels His-Tag nachweisbar und zeigte aggregiertes Protein. Auch für Iho0391 konnte nach der Reinigung im Western Blot gegen den C-terminalen His-Tag ein Signal auf Höhe von circa 70 kDa nachgewiesen werden, welches nicht durch GFP Fluoreszenz zu visualisieren war (Abb. 17). Es kam also bei der Expression von Iho0391 nicht nur zur Aggregation des Proteins, sondern auch zu einem (dadurch bedingten) Abbau.

3.4.3 Heterologe Expression in eukaryotischen Systemen

3.4.3.1 Klonierung von Iho0391

Der putative MFS Transporter Iho0391 wurde nicht nur in *E. coli* exprimiert (siehe 3.4.2), sondern auch für die heterologe Expression in zwei eukaryotischen Wirten verwendet.

Für die Expression in *P. pastoris* wurde der Transporter codonoptimiert (Firma Genscript USA Inc., Piscataway, USA), mit einem entfernbaren (Thrombin Schnittstelle) 10-fachen His-Tag am C-Terminus versehen und als synthetisches Gen in den Vektor pPIC3.5k eingebracht.

Für die Expression in der Insektenzellkulturlinie Sf9 wurde das für *P. pastoris* codonoptimierte Konstrukt aus dem Vektor pPIC3.5k mittels Restriktionsenzymen heraus geschnitten und in den

Transfervektor pVL1393 eingebracht. Dieser Vektor konnte sowohl für die Klonierung in *E. coli* als auch für die spätere Expression in Sf9 Zellen genutzt werden.

3.4.3.2 Expression von Iho0391 in Sf9

Nach positiver Sequenzierung der erhaltenen *E. coli* Klone wurde das rekombinante Plasmid vermehrt und für die Herstellung rekombinanter Baculoviren mittels flashBAC™ System vermehrt (siehe 2.10.2.2.5). Auch nach mehrmaliger Wiederholung des Plaque-Assays (siehe 2.10.2.2.6) konnte kein Virustiter bestimmt werden, da bei keiner Verdünnungsstufe definierte Plaques zu erkennen waren. Vermutlich muss das Protokoll für die Durchführung der Plaque-Assays geändert bzw. optimiert werden, weil es im Labor auch für andere rekombinante Viren zu Problemen bei der Titerbestimmung kam (mündliche Aussage Dr. Karin Barbinger und Sabine Ruppl, Universität Regensburg). Trotzdem wurde eine Transfektion der Sf9 Zellen vorgenommen, da die infizierten Insektenzellen während der Herstellung der rekombinanten Viren im Vergleich zu nicht infizierten Zellen aufgebläht und verändert aussahen. Die Transfektion der Sf9 Zellen erfolgte mit drei unterschiedlichen Verdünnungen des P2 Virusüberstandes (1:10, 1:100 und 1:1000). Nach Infektion von je 50 ml Insektenzellen (3×10^6 Zellen/ml) mit der entsprechenden Virusmenge, erfolgte die Inkubation für 48 h bei 27 °C. Die Ernte sowie die Membranpräparation erfolgten wie beschrieben (siehe 2.10.2.2.7 und 2.11). Die Lowspin-Pellets sowie der Überstand und das Pellet (Δ Membranen) nach der Ultrazentrifugation wurden zum Vergleich aufgetragen (Abb. 18).

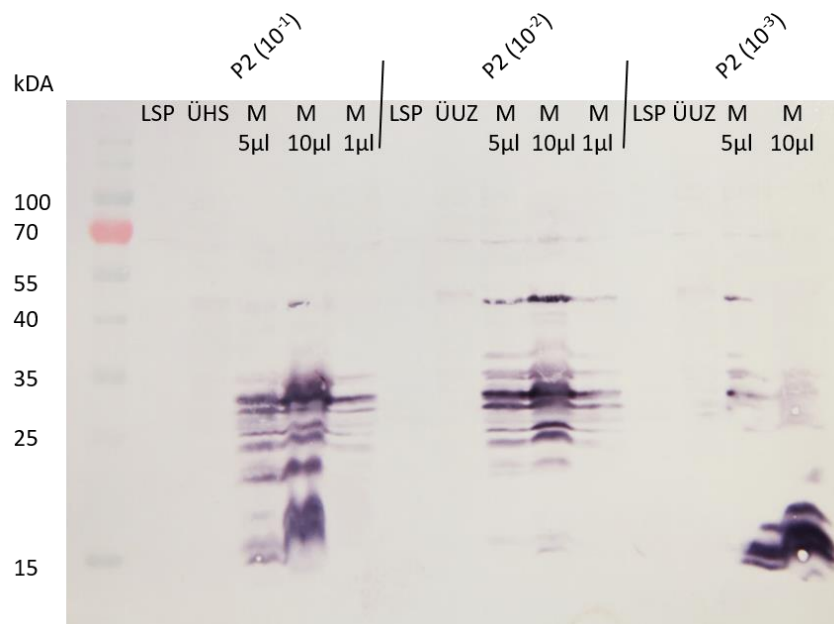
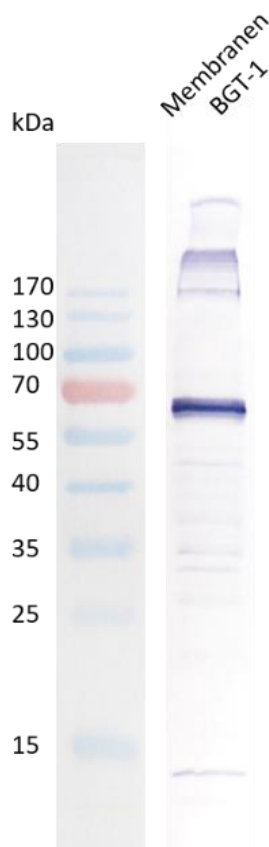


Abbildung 18: Expression von Iho0391 in Sf9 Zellen nach Infektion mit verschiedenen Viruskonzentrationen (P2). Nach dem Zellaufschluss und der Zentrifugation wurden das Lowspin-Pellet (LSP), der Überstand (ÜHS) und unterschiedliche Mengen des Pellet (M) der Highspin-Zentrifugation im Vergleich aufgetragen; Immunoblot mit Antikörper gegen den C-terminalen 10x Histidin-Tag am Protein.

Während der Membranpräparation wurde scheinbar so gut wie kein Protein verloren, da in den Banden der Lowspinpellets und den Überständen des Highspins keine Signale zu detektieren waren. In den Membranen steigt mit der Auftragsmenge (1–10 µl) auch die Stärke des Signals an. Allerdings ist in den Membranen kein einzelnes Signal erkennbar, sondern diverse Banden mit apparenten Molekulargewichten zwischen 45 und 15 kDa. Auch die Menge des eingesetzten Virustiters beeinflusste die Expression. Die beiden Viruskonzentrationen von 10^{-1} sowie 10^{-2} lieferten ein nahezu identisches Bandenmuster, mit dem Unterschied, dass bei einer Konzentration von 10^{-1} zusätzlich starke Signale zwischen 15 und 20 kDa auftraten. Diese waren auch bei einer Viruskonzentration von 10^{-3} zu finden, allerdings waren in diesem Fall kaum Banden zwischen 30 und 35 kDa zu detektieren. Für Iho0391 wird eine Größe von 44,2 kDa vorhergesagt, das detektierte Signal für die Expression in *P. pastoris* war bei circa 37 kDa auf einem SDS-Gel zu finden.



Um ausschließen zu können, dass das erhaltene Bandenmuster ein Artefakt einer Expression in Sf9 Zellen an sich ist bzw. dass kein Fehler durch fehlende Erfahrung mit dem Expressionssystem gemacht wurde, wurde eine Positivkontrolle verwendet. Da ein Membranprotein aus Säugetieren, der Betain-GABA-Transporter BGT-1 aus der Niere, von Dr. Eva Schweikhard (MPI für Biophysik, Frankfurt) bereits erfolgreich in Sf9 Zellen exprimiert worden war, wurden für diese Arbeit Sf9 Zellen mit dem entsprechenden rekombinanten Virus infiziert (Konzentration 10^{-2}) und für 72 h bei 27 °C inkubiert, geerntet und die Membranen entsprechend präpariert.

Wie bereits von Dr. Eva Schweikhard beschrieben, resultierte die Expression von BGT-1 in Sf9 Zellen in einem Protein, das ein Western Blot Signal etwas unterhalb der 70 kDa Markierung lieferte (Schweikhard, 2013). Das Ergebnis war auch hier reproduzierbar (Abb.19). Obwohl einige schwache Banden unterhalb der 70 kDa Markierung zu erahnen sind, ist doch ein eindeutig erkennbares Signal von dem BGT-1 Transporter auszumachen.

Abbildung 19: Expression von BGT-1 in Sf9 Zellen. Nach dem Zellaufschluss wurden die präparierten Membranen aufgetragen; Immunoblot mit Antikörper (poly-His) gegen den C-terminalen 10x Histidin-Tag am Protein

Die Expression von Iho0391 in Sf9 lieferte kein einzelnes Signal im Western Blot, sondern nur ein Muster aus vermeintlichen Abbaubanden. Ein ähnliches Bild war auch schon für die GFP-getaggte Expression von Iho0391 in *E. coli* zu beobachten (siehe 3.4.2). Da die Menge des eingesetzten Virustiters aber das Bandenmuster beeinflusste, wurde davon ausgegangen, dass die Herstellung der

rekombinanten Viren prinzipiell funktioniert hat. Um diese Annahme zu untermauern hätten jedoch auch Proben nicht infizierter Zellen untersucht werden müssen. Die Expression eines Kontrollproteins (BGT-1) bestätigte, dass zumindest das System an sich funktionierte. Da im Gegensatz dazu die Expression von Iho0391 in *P. pastoris* vielversprechendere Resultate lieferte (siehe 3.4.3.3), wurde die Expression in Sf9 Zellen nicht mehr weiter verfolgt und dementsprechend auch keine Reinigung durchgeführt.

3.4.3.3 Expression von Iho0391 in *P. pastoris*

Eine erste Testexpression (MM-Medium, 1 % (v/v) Methanol), ein Detergenz Screen, sowie eine darauf folgende vorläufige Reinigung im Batch-Verfahren wurden zunächst am MPI für Biophysik (Frankfurt) von Dr. Eva Schweikhard vorgenommen. Wie gezeigt werden konnte, verlief die Expression von Iho0391 in *P. pastoris* erfolgreich. Schon in den präparierten Membranen der als positiv getesteten Klone (Abb. 20) konnte ein Western Blot Signal auf Höhe von 37 kDa festgestellt werden. Für Iho0391 wird eine Größe von 44,2 kDa vorhergesagt. Die beobachtete Abweichung kann durch die hydrophoben Eigenschaften von Membranproteinen und der damit verbundenen veränderten Bindekapazität für SDS erklärt werden

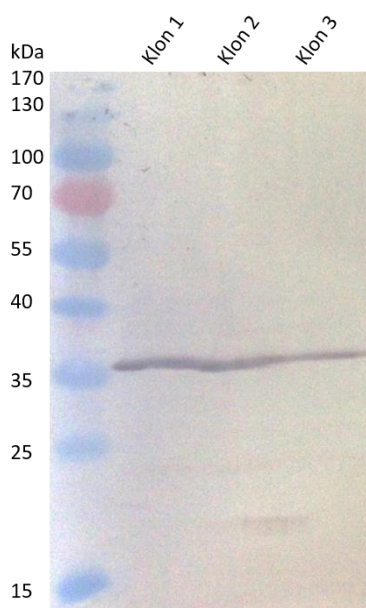
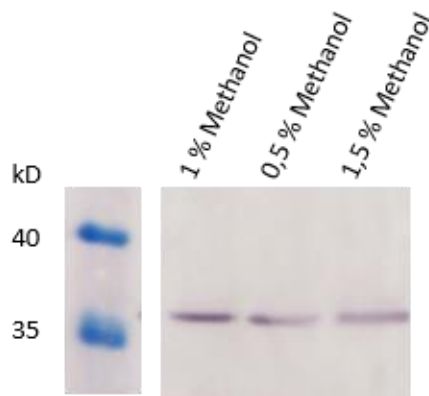


Abbildung 20: Nachweis der Expression von Iho0391 in Membranen von *P. pastoris* Klonen. Immunoblot der Membranen von Klonen mit dem höchsten Expressionslevel; Antikörper (poly-His) gegen den C-terminalen 10x Histidin-Tag am Protein (Bild: Dr. Eva Schweikhard).

Da diese Ergebnisse sehr vielversprechend aussahen, wurde versucht die Experimente in Regensburg zu reproduzieren und dabei gleichzeitig verschiedene Schritte der Expression und Reinigung zu optimieren. Ausgehend von den entsprechenden *P. pastoris* Klonen aus Frankfurt erfolgte zuerst ein Test unterschiedlicher Expressionsmedien (siehe 2.3.3). Nach Anzucht von Vorkulturen auf YPD-Medium, wurden die Zellen entweder in Minimalmedium (MGY und MM), gepuffertes Minimalmedium (BMG und BMM) oder gepuffertes Komplexmedium (BMGY und BMMY) überführt

und darin kultiviert. Die Expression erfolgte für jeweils 24 h mit je 0,5 % (v/v) Methanol. Die präparierten Membranen wurden durch SDS-PAGE und Western Blot analysiert (hier nicht gezeigt). Wie sich herausstellte, hatten die unterschiedlichen Medien keinen erkennbaren Einfluss auf die Qualität und Menge des exprimierten Proteins Iho0391. Deswegen wurde für alle weiteren Versuche Minimalmedium verwendet. Um zu untersuchen, ob die Methanolkonzentration einen Einfluss auf die Expression hatte, wurden Ansätze in MM-Medium mit je 0,5, 1,0 und 1,5 % (v/v) Methanol erstellt (Abb. 21). Es waren keine gravierenden Unterschiede hinsichtlich der verwendeten Methanolkonzentration zu erkennen. Jedoch schien eine Konzentration von 1 % (v/v) Methanol ein



etwas stärkeres Signal im Western Blot zu liefern, weshalb mit dieser Bedingung weitergearbeitet wurde. In einem Expressionsvolumen von 12 l konnten so Membranen (15 ml) mit einer Gesamtproteinkonzentration von 37 mg/ml gewonnen werden.

Abbildung 21: Test verschiedener Methanolkonzentrationen im Expressionsmedium. Die Expression von Iho0391 wurde in MM Medium mit 0,5, 1 und 1,5 % (v/v) Methanol durchgeführt und die präparierten Membranen im Vergleich aufgetragen; Immunoblot mit Antikörper gegen den C-terminalen 10x Histidin-Tag am Protein.

3.4.3.3.1 Reinigung von Iho0391

Nach einem Detergenz Screen (Abb. 22) wurden DM, NG und Cymal 5 zur Solubilisierung von Iho0391 aus den präparierten *P. pastoris* Membranen ausgewählt.

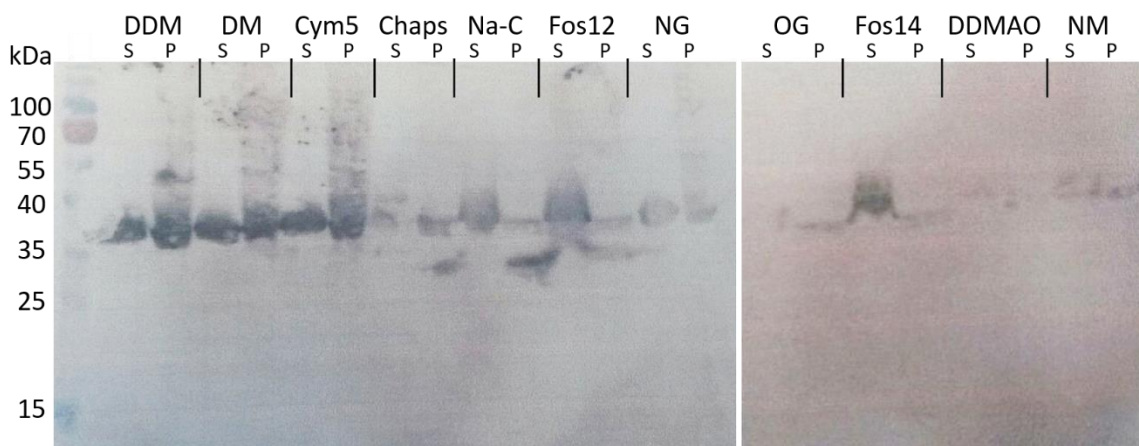


Abbildung 22: Solubilisierung von Iho0391 mit verschiedenen Detergenzien. Solubilisierung mit je 1,67 % Detergenz für 1 h bei 4 °C. Im Vergleich wurden Solubilisat (S) und Pellet (P) nach der Ultrazentrifugation aufgetragen; Immunoblot mit Antikörper (poly-His) gegen den C-terminalen 10x Histidin-Tag am Protein (Bild: Dr. Eva Schweikhard).

Die Solubilisierungseffizienz der drei nichtionischen Tenside lag bei circa 50 %. DDM und Chaps solubilisierte etwas schlechter (30–40 %). Für DDMAO, NM und OG ließen sich keine gut erkennbaren Signale im Western Blot nachweisen. Die beiden Fos-Choline solubilisierten zwar gut, jedoch war auch in diesen beiden Fällen das Signal insgesamt schwächer und erschien im Gegensatz zu den anderen Proben leicht erhöht.

Die His-Tag basierte Reinigung erfolgte sowohl im Durchlauf- als auch im Batch-Verfahren über das ÄKTA Chromatographiesystem (siehe 2.13.1). Exemplarisch ist das Eluat einer ersten Test-Aufreinigung im Batch-Verfahren nach Solubilisierung mit 2 % (v/v) NG auf ein Comassie gefärbtes SDS-Gel aufgetragen (Abb. 23). Der Reinigungspuffer enthielt 0,1 % (v/v) Detergenz. Das erwartete Signal auf Höhe von etwa 37 kDa konnte auch nach der Reinigung reproduziert werden. Es waren keinerlei Abbaubanden zu detektieren. Es waren lediglich eine schwache Bande auf einer Höhe von circa 110 kDa und mehrere leichte Banden („Schmier“) über der 170 kDa Markierung zu sehen.

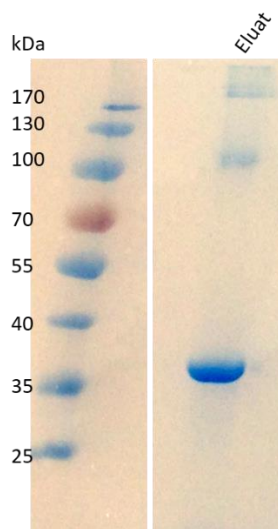


Abbildung 23: Aufreinigung von lho0391 im Batch-Verfahren nach Solubilisierung mit NG. Die Solubilisierung erfolgte für 1 h bei 4 °C mit 2 % (v/v) NG; das Eluat (300 mM Imidazol) wurde anschließend auf ein SDS-Gel aufgetragen und Comassie gefärbt (Bild: Dr. Eva Schweikhard).

Die Reinigung sollte im nächsten Schritt im Durchlauf-Verfahren wiederholt werden, um sauberes Protein in ausreichender Menge für eine Gelfiltration und Kristallisationsansätze zu erhalten.

Zuerst wurden dazu einige Optimierungsschritte hinsichtlich geeigneter Imidazolkonzentrationen zum Waschen und Eluieren durchgeführt. Außerdem wurde dabei nochmal ein Vergleich von Cymal 5, NG und DM für die Solubilisierung und Reinigung angestellt. Wie sich zeigte, war DM für eine effiziente Reinigung am besten geeignet. Waschschritt 1 erfolgte anders als sonst mit 40 mM Imidazol. Wash 2 wurde mit 80 mM und die anschließende Elution mit 500 mM Imidazol durchgeführt. Im Reinigungspuffer befanden sich 0,3 % (v/v) DM. Das Protein konnte ohne Verunreinigungen aufgereinigt werden (Abb. 24).

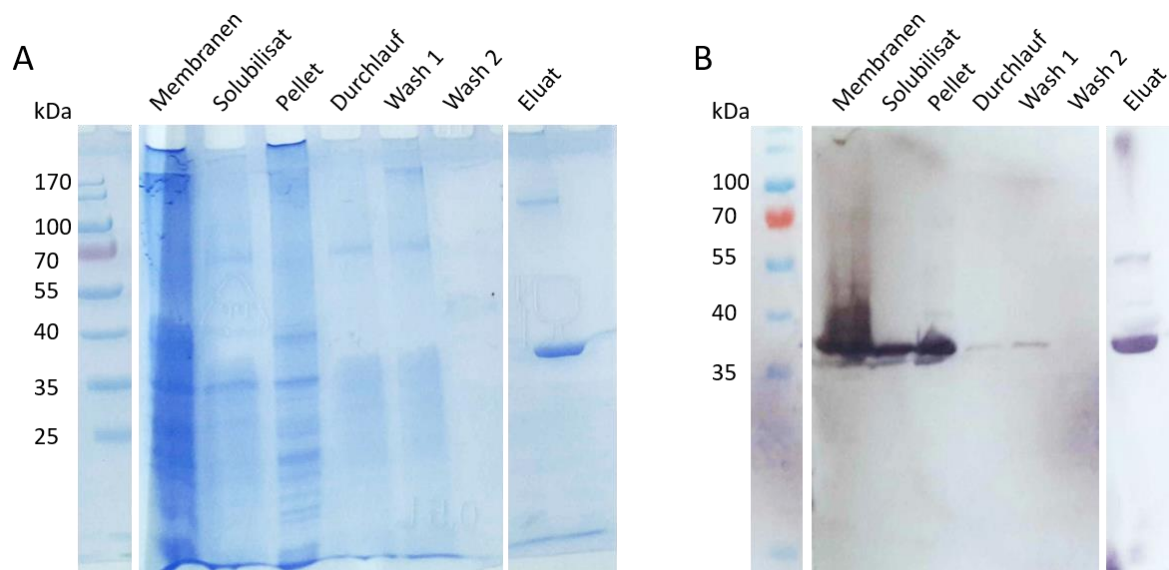
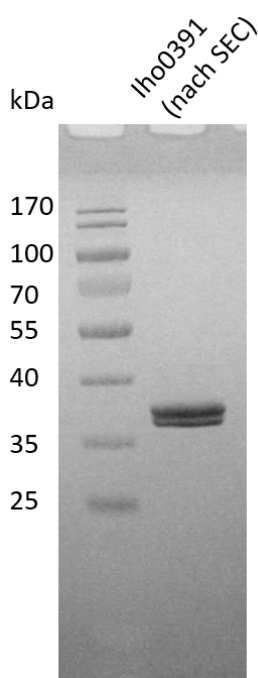


Abbildung 24: IMAC von Iho0391 im Durchlauf-Verfahren. Die Solubilisierung erfolgte mit 2 % (v/v) DM. Für die Reinigung wurde eine HiTrap™ Chelating HP Säule verwendet. Wash 1 erfolgte mit 20 mM Imidazol, Wash 2 mit 80 mM Imidazol, Elution mit 500 mM Imidazol. (A) Coomassie-Färbung, (B) Immunoblot mit Antikörper gegen den C-terminalen 10x Histidin-Tag.

Im Eluat trat das erwartete Signal auf Höhe von etwa 37 kDa auf. Im Western Blot zeigte sich in dieser Probe zusätzlich ein Signal bei circa 55 kDa (Abb. 24 B), welches im Coomassie-Gel jedoch nicht zu sehen war (Abb. 24 A). Hier konnte nur eine weitere Bande bei 110 kDa detektiert werden. Das Protein hatte nahezu vollständig an die Säule gebunden, da nur ein sehr schwaches Western Blot Signal im Durchfluss nachzuweisen war.

Nach Entfernung des Imidazols wurde das eluierte Protein aufkonzentriert und im Anschluss einer Gelfiltration unterzogen (hier nicht gezeigt). Es trat ein monodisperser Peak auf, allerdings zeigte sich



nach Analyse der zugehörigen Fraktion mittels SDS-PAGE eine Doppelbande auf Höhe von 37 kDa (Abb. 25). Scheinbar wurde das Protein während des SEC Laufes destabilisiert. Da durch Erstellung eines Homologiemodells für Iho0391 (siehe 3.4.1) Vermutungen hinsichtlich einer möglichen ATP-Transport-Funktion gab, wurde die Gelfiltration nochmals wiederholt. Die Proben sollten aber diesmal nach Inkubation mit Mg-ATP analysiert werden. Dazu wurden 5 ml des gereinigten Proteins nach der IMAC in zwei Ansätze aufgeteilt. Nur einer Probe wurden 5 mM Mg-ATP zugefügt. Beide Proben wurden üN bei 4 °C auf Eis im Dunkeln und unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden beide Proben in zwei separaten Chromatographieläufen untersucht (Abb. 26).

Abbildung 25: SEC von Iho0391. SDS-PAGE des mono-dispersen Peaks aus der Gelfiltration.

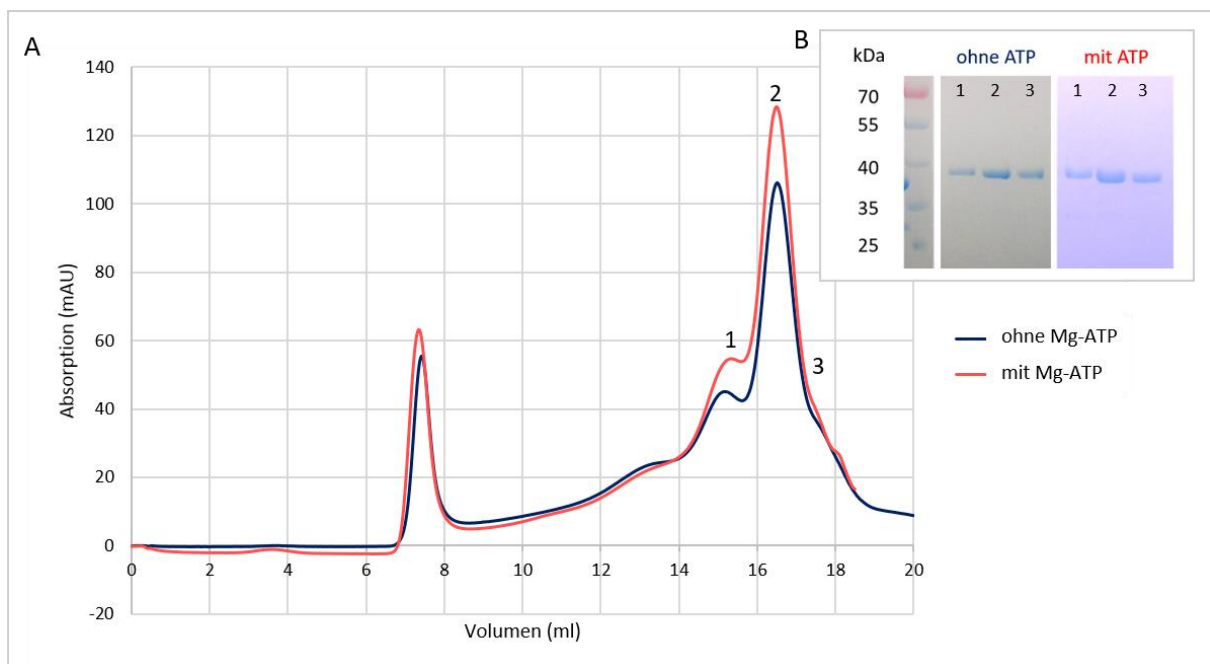


Abbildung 26: SEC von Iho0391 in Abhängigkeit von Mg-ATP. (A) Chromatogramm der SEC (Superose 6 10/300 GL), Auftrag der UV-Absorption bei 280 nm, blau (–): Probe ohne Mg-ATP, rot (–) Probe mit Mg-ATP, (B) SDS-PAGE der Proben des zweiten Peaks (jeweils 1–3).

Die beiden Chromatogramme unterschieden sich nur geringfügig. In beiden Fällen zeigte sich zwischen 6 und 8 ml ein Aggregatpeak. Kurz vor dem Hauptpeak (2) zeigt sich jeweils eine Schulter (1), die für den Ansatz mit Mg-ATP etwas höher ausfällt. Insgesamt fällt der Hauptpeak für die Probe mit Mg-ATP höher aus. Die Analyse der drei Fraktionen aus der Gelfiltration mittels SDS-PAGE zeigte keinerlei Unterschiede. Allerdings traten keine Doppelbanden, wie zuvor für die SEC beobachtet, mehr auf. Die Zugabe von Mg-ATP hatte somit keinen positiven, aber auch keinen negativen Effekt auf Iho0391. Die genaue Ursache der Destabilisierung des Proteins nach dem ersten Chromatographielauf blieb ungeklärt. Der einzige Unterschied zwischen den Proben bestand in der An- bzw. Abwesenheit von Imidazol. Vor einem SEC Lauf werden die Proteinproben konzentriert und deswegen wird für gewöhnlich vorher das Imidazol entfernt, da hohe Imidazolkonzentrationen ein Ausfällen der Proteine zur Folge haben können. Für den SEC Lauf, in dem die Doppelbanden auftraten wurde das Imidazol also entsprechen vorher entfernt. In den nachfolgenden beiden Läufen (Ansätze mit/ohne Mg-ATP) wurde dieser Schritt weggelassen und die Proben mit Imidazol auf die Gelfiltrationssäule aufgetragen. Es gibt Berichte, dass Imidazol z.B. auf die Reinigung von His-getaggten Antikörpern einen stabilisierenden Effekt hat und sie nur zusammen mit Imidazol in Lösung gehalten werden können (Hamilton *et al.*, 2003). Allerdings wurde bei der Reinigung von Iho0391 durch die Gelfiltration das Imidazol aus den Proben entfernt, es war also in den eluierten Proteinproben nicht mehr enthalten. Genau diese Proben wurden mittels SDS-PAGE analysiert und wiesen keine Doppelbanden mehr auf.

Eindeutig zu sehen war nur, dass die Zugabe von Mg-ATP weder einen deutlich positiven noch negativen Effekt auf die Proteinproben während der Gelfiltration hatte.

3.4.3.3.2 Funktionelle Analyse von Iho0391

Die Hypothese hinsichtlich einer ATP-Bindung durch Iho0391 sollte durch eine Bindestudie mit Mg-ATP nochmals getestet werden. Tryptophan diente dabei als Fluorophor. Steigende ATP-Konzentrationen (1–10 mM) führten zu einer sichtbaren Abnahme der Tryptophanfluoreszenz (Abb. 27). Die korrigierten maximalen Fluoreszenzwerte betrugen vor Zugabe von Mg-ATP durchschnittlich 310 mAU, nach Zugabe von insgesamt 10 mM Mg-ATP sanken die Werte auf durchschnittlich 200 mAU ab. Zur Kontrolle wurde die Fluoreszenz des verwendeten Puffers bei gleichen Reaktionsbedingungen in Ab- und Anwesenheit von Mg-ATP gemessen. Ohne Mg-ATP lag der Wert bei 0,8 mAU, nach Zugabe von 10 mM Mg-ATP stieg die Fluoreszenz sogar leicht auf 4,7 mAU an.

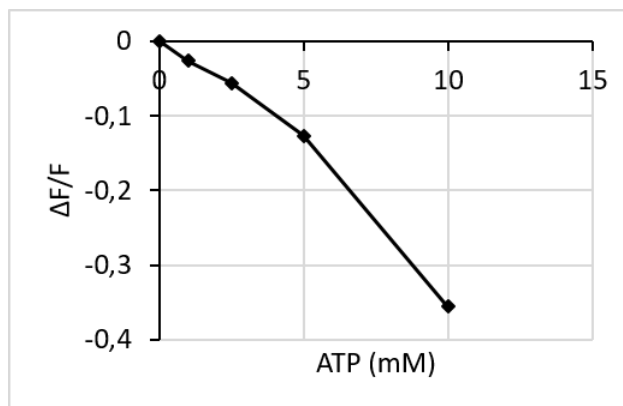


Abbildung 27: Tryptophan-Fluoreszenzmessung von Iho0391 in Abhängigkeit von Mg-ATP. Die Substratkonzentration wurde gegen die Fluoreszenzänderung $\Delta F/F$ aufgetragen.

Aus *P. pastoris* gereinigtes Protein wurde auch für die Herstellung von Kristallisationsansätzen verwendet. Die Proben wurden entsalzt und auf circa 5–10 mg/ml aufkonzentriert. Die Kristallisation wurden wie beschrieben (siehe 2.15) in 96-well Platten durchgeführt. Dabei wurden fertige Screening-Lösungen des MemGold™ HT-96 und des MemStart/MemSys™ Screens verwendet. Die Platten wurden bei 18 °C inkubiert und regelmäßig auf Kristallbildung überprüft. Eine Kristallbildung konnte jedoch nicht beobachtet werden. Da Iho0391 aber ein MFS Transporter ist, könnte es durchaus möglich sein, dass ohne vorhandenen Liganden keine Kristallisation möglich ist. In der Literatur finden sich zahlreiche Beispiele für Transporter der Superfamilie, für welche nur zusammen mit einem entsprechenden Liganden Kristalle erzeugt werden konnten. Das gilt sowohl für prokaryotische MFS Proteine wie LacY (1PV7; Abramson *et al.*, 2003), FucP (307P; Dang *et al.*, 2010) oder PiPT (4J05; Pedersen *et al.*, 2013) als auch für eukaryotische Vertreter wie NarK (4U4T; Fukuda *et al.*, 2015), NRT1.1 (4OH3; Sun *et al.*, 2014) oder GLUT1 (4PYP; Deng *et al.*, 2014). Aus diesem Grund wurden für

Iho0391 nach Zugabe von 5 mM Mg-ATP nochmal ein Kristallisations Screen (MemGold™ HT-96) angesetzt. Trotzdem konnte bis jetzt (vier Wochen Inkubationszeit) noch für keine der Bedingungen eine Kristallbildung beobachtet werden.

3.4.3.3.3 Lokalisation von Iho0391

Um die Lokalisation von Iho0391 in *I. hospitalis* zu untersuchen, wurde nach einer Reinigung mittels IMAC die resultierende Proteinbande bei circa 37 kDa aus einem SDS-Gel ausgeschnitten und diese an die Firma Davids (Davids Biotechnologie, Regensburg) weitergegeben. Zur Gewinnung von Antikörpern (anti-Iho0391) wurde das Protein einem Kaninchen injiziert und das Antiserum nach 2 Monaten gewonnen. Dieses wurde für TEM-Immunlokalisationen und Western Blot Analysen von Iho0391 verwendet. Der Antikörper markierte vor allem in der OCM von *I. hospitalis* (Abb. 28 A). Weitere Signale konnten im Cytoplasma bzw. dessen röhrenförmigen Ausläufern detektiert werden. Das Testserum des generierten Antikörpers wurde auch in verschiedenen Konzentrationen für Western Blots eingesetzt. In einer Probe des Eluat von Iho0391 nach einer IMAC war bei der niedrigsten Antikörper-Verdünnung (anti-Iho0391 1:100) ein schwaches Signal auf der adäquaten Höhe zu erkennen (Abb. 28 B, rote Markierung). Außerdem waren auf Höhe von circa 25 und 70 kDa sowie oberhalb der 170 kDa Markierung weitere schwache Banden zu beobachten.

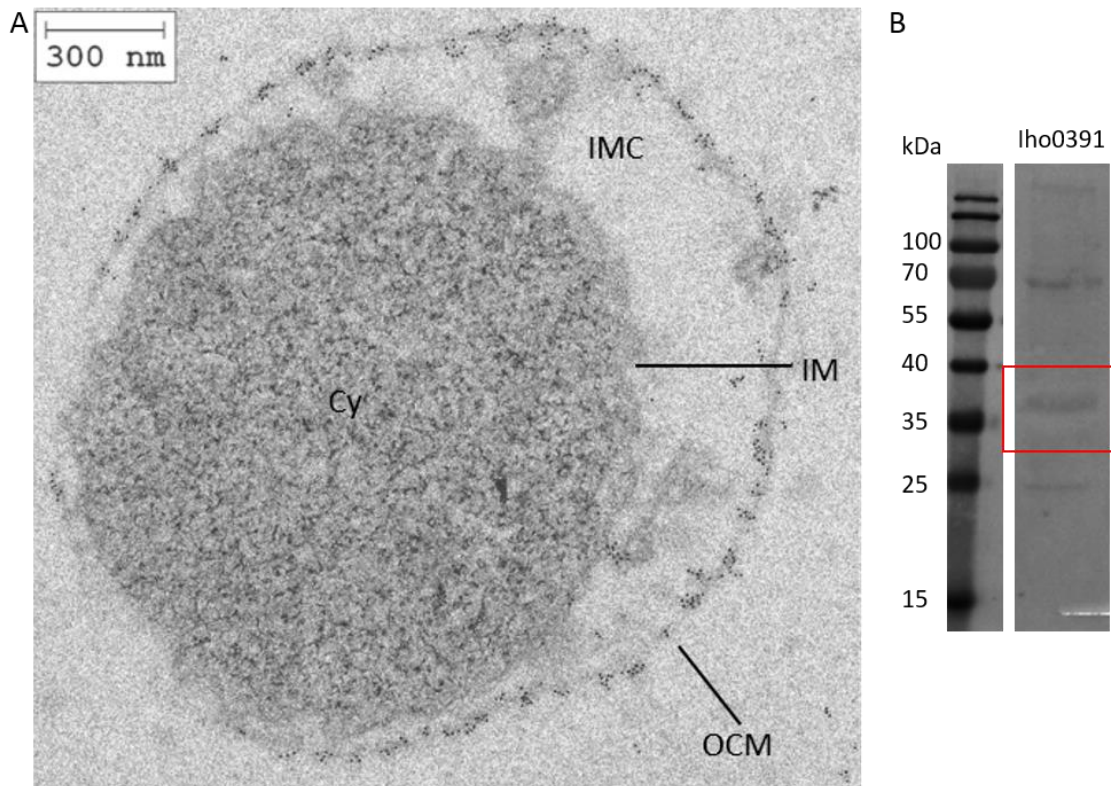


Abbildung 28: Immunlokalisation von Iho0391 und Spezifitätsnachweis des Antikörpers anti-Iho0391. (A) Immunmarkierung einem Ultradünnschnitt von *I. hospitalis*; der 1° AK (anti-Iho0391) wurden 1:50 und der 2° AK (goat anti-rabbit IgG + 6 nm gold) 1:20 eingesetzt; Cy= Cytoplasma, IMC = Intermembran Kompartiment, IM = innere Membran, OCM = äußere Zellmembran (Bild: Veronika Heinz), (B) Western Blot des Eluats nach einer IMAC von Iho0391 mit anti-Iho0391 (1:100).

3.5 Heterologe Expression des Anionenkanals Neq014 in *E. coli*

Da *I. hospitalis* der einzige bekannte Wirt für *N. equitans* ist und über das Zusammenspiel der Cokultur, vor allem hinsichtlich Stoffaustausch und Transportvorgängen, bisher kaum Details bekannt sind, sollten in dieser Arbeit Transporter von *N. equitans* untersucht werden. Von den zehn annotierten Transportern aus seinem Genom wurde das als C₄-Dicarboxylat Transporter hinterlegte Protein Neq014 ausgewählt. Das Protein ist mit einem Molekulargewicht von 35,8 kDa und 10 TMHs annotiert. Durch bioinformatische Analysen der Sequenz von Neq014 wurde festgestellt, dass dieses Protein nicht nur Ähnlichkeiten zu C₄-Dicarboxylat Transportern von Bakterien und Pilzen aufweist, sondern dass Neq014 auch als spannungs-abhängiger Anionenkanal (SLAC1 Familie), wie in Pflanzen zu finden, fungieren könnte. Für das Membranprotein Neq014 von *N. equitans* sollte ebenfalls ein heterologes Expressionssystem etabliert werden.

3.5.1 Klonierung von Neq014

Die Klonierung des Kanals wurde zunächst von Dr. Kristian Parey durchgeführt. Das Gen wurde aus genomischer DNA von *N. equitans* (freundlicherweise bereitgestellt von Gabi Leichtl, Universität Regensburg) kloniert und in den Vektor pTTQ18-A2 eingebracht. Nach Erhalt positiver Klone, wurden verschiedene Expressionsstudien durchgeführt.

Parallel dazu wurde Neq014 nach Codonoptimierung für die Expression in *E. coli*, als synthetisches Gen in den Vektor pET-26b(+) eingebracht. Das erhaltene rekombinante Plasmid konnte sofort für die Expression verwendet werden.

3.5.2 Expression und Reinigung von Neq014 (nicht-codonoptimiert)

Nach ersten Testexpressionen (LB Medium, 37 °C, 1 mM IPTG) des nicht-codonoptimierten Neq014 in *E. coli* NM554, konnten Western Blot Signale auf Höhe von circa 30 kDa detektiert werden (mündliche Mitteilung Dr. Kristian Parey und Dr. Chitra Rajendran). Dies sollte im Folgenden reproduziert und verschiedene Expressionsbedingungen variiert werden. Zunächst wurde die Expression in drei unterschiedlichen *E. coli* Stämmen getestet (siehe Abb. 29 A). Im Bereich zwischen 70 und 20 kDa waren etliche Banden zu erkennen. Auf Höhen von etwa 30 kDa (rote Markierung), wo Neq014 bereits detektiert wurde, war auch hier eine entsprechende Bande zu sehen. Allerdings war diese insgesamt sehr schwach, für NM554 Zellen aber noch etwas stärker als bei C41 und C43 Zellen. Da in einem Volumen von nur 100 ml kultiviert wurde, sollte die Expression in NM554 in einem größeren Volumen wiederholt und die Expressionsbedingungen weiter optimiert werden. Nach dem Vergleich zweier Expressionsmedien (LB und 2YT), unterschiedlicher IPTG Konzentrationen (1 mM und 0,8 mM) und verschiedener Erntezeitpunkte (3 oder 6 h bei 37 °C oder üN bei 20 °C nach Induktion) ließ sich die

Überexpression von Neq014 verbessern. Eine Kultivierung der Zellen in 2YT Medium, eine Induktion mit 0,8 mM IPTG in Verbindung mit einer Temperaturabsenkung auf 20 °C nach der Induktion und einem Wachstum üN stellte sich als besonders effizient heraus. Die Zellen erreichten dabei eine OD₆₀₀ von 4,9 und für einen 2 l Expressionsansatz wurde eine Gesamtproteinkonzentration von 25 mg/ml (Membranen, 5 ml) ermittelt. In den präparierten Membranen einer solchen Expression waren neben dem erwarteten Signal bei 30 kDa eine Reihe von Abbaubanden mit niedrigerer molekularer Masse detektierbar (Abb. 29 B).

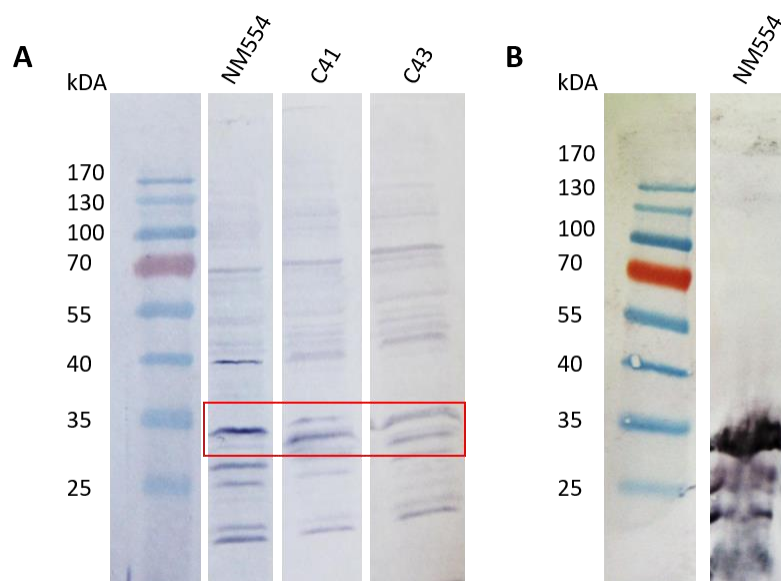


Abbildung 29: Nachweis der Expression von Neq014 in Membranen von *E. coli*. (A) Vergleich der Expressionsstämme NM554, C41 und C43 (Expressionsbedingungen: je 100 ml LB Medium, 37 °C, 1 mM IPTG, Ernte 3 h nach Induktion), (B) Expression in NM554 Zellen (Expressionsbedingung: 2 l LB Medium, 0,8 mM IPTG, Ernte nach Induktion üN bei 20 °C); Immunoblots mit Antikörper gegen den C-terminalen 10x Histidin-Tag am Protein.

Nach der Solubilisierung mit verschiedenen Detergenzien zeigten sich sogar Doppelbanden auf der erwarteten Höhe des Zielproteins und im Solubilisat waren viele Signale, vermutlich Verunreinigungen (sogenannte *host cell* Proteine), zu sehen (Abb. 30). Aus diesem Grund wurde eine Hitzefällung durchgeführt, um die Proteine des mesophilen Expressionswirt *E. coli* zu denaturieren und das Zielprotein Neq014 aus dem hyperthermophilen Organismus *N. equitans* in vorgereinigter Form zu erhalten (Abb. 31). Für die Hitzefällung wurde DDM zur Solubilisierung ausgewählt. Die Solubilisierungseffizienz war zwar etwas schlechter als bei den beiden Fos-Cholinen, jedoch waren die beobachteten Doppelbanden sowohl bei Fos14 als auch Fos12 stärker ausgeprägt (Abb. 30). NG, OG sowie Cymal 5 und Cymal 6 erwiesen sich als eher ungeeignete Detergenzien.

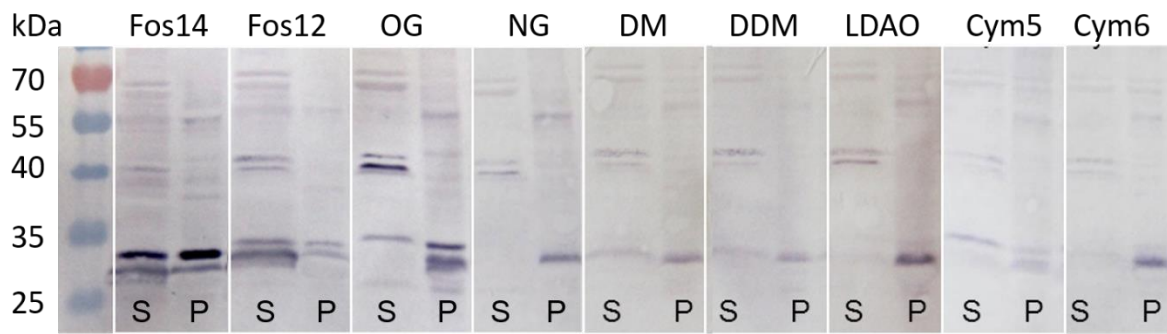


Abbildung 30: Solubilisierung von Neq014 mit verschiedenen Detergenzien. Solubilisierung mit je 1,67 % Detergenz für 1 h bei RT. Im Vergleich wurden Solubilisat (S) und Pellet (P) nach der Ultrazentrifugation aufgetragen; Immunoblot mit Antikörper gegen den C-terminalen 10x Histidin-Tag am Protein.

Die Hitzefällung erfolgte nach der Solubilisierung, jedoch noch vor der Ultrazentrifugation. Die Proben wurden dazu für 30 min bei 45 °C, 20 min bei 60 °C oder 15 min bei 90 °C erhitzt. Tatsächlich ließen sich dadurch zahlreiche Verunreinigungen fällen (Abb. 31). Wie sich jedoch herausstellte, hatte schon eine Temperatur von 45 °C ebenfalls negative Auswirkungen auf die Solubilisierung von Neq014. Das Protein blieb bei Hitzeeinwirkung nicht stabil und fiel aus (Nachweis im Pellet).

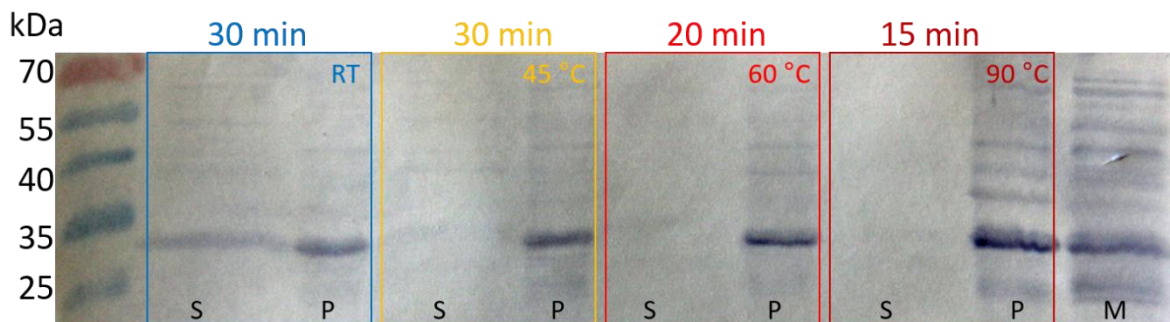
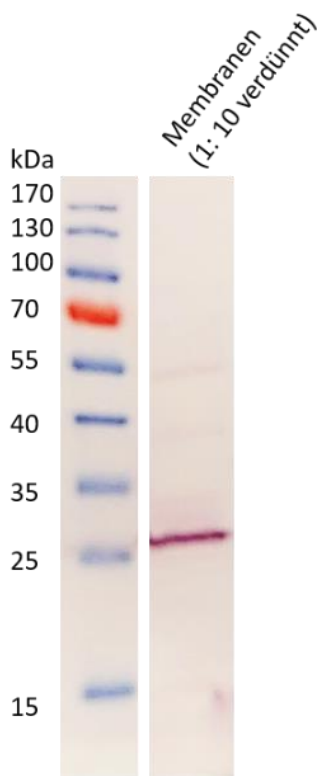


Abbildung 31: Temperaturgradienten nach Solubilisierung von Neq014 mit DDM. Hitzefällung (30 min bei RT, 30 min bei 45 °C, 20 min bei 60 °C und 15 min bei 90 °C) der *E. coli* Proteine nach Solubilisierung für 1 h bei RT mit je 1,67 % Detergenz, M = Membranen, S = Solubilisat, P = Pellet; Immunoblot mit Antikörper gegen den C-terminalen 10x Histidin-Tag am Protein.

Aufgrund des Auftretens vieler verschiedener Banden und der fehlenden Möglichkeit das Solubilisat durch Hitzefällung zu behandeln, wurde keine His-Tag basierte Reinigung des nicht-codonoptimierten Konstrukts mehr durchgeführt. Parallel dazu wurde aber mit dem codonoptimierten Konstrukt von Neq014 gearbeitet und es zeigten sich dafür weitaus bessere Ergebnisse.

3.5.3 Expression, Reinigung und Analyse von Neq014 (codonoptimiert)

Nachdem sich herausgestellt hatte, dass die Expression des nicht-codonoptimierten Konstrukts in *E. coli* NM554 in 2YT Medium und eine Induktion mit 0,8 mM IPTG in Verbindung mit einer



Temperaturabsenkung auf 20 °C optimal war, wurden diese Bedingungen für eine erste Testexpression des codonoptimierten Konstrukts verwendet. Einzige Ausnahme war jedoch die Verwendung des *E. coli* Stammes BL21 Star anstelle von NM554. In einem Expressionsvolumen von 12 l konnten so Membranen (15 ml) mit einer Gesamtproteinkonzentration von 42 mg/ml gewonnen werden. Die Zellen erreichten dabei eine OD₆₀₀ von 1,8–2,2. In den präparierten Membranen aus einer solchen Expression zeigte sich ein einzelnes Blotsignal auf einer Höhe von circa 27 kDa (Abb. 32), welches etwas tiefer lag als das Signal für das nicht-codonoptimierte Konstrukt. Dieses wurde aber in den Vektor pTTQ18-A2 der einen 10-fachen His-Tag beinhaltet kloniert, wohingegen Neq014 nach der Codonoptimierung in das Plasmid pET-26b(+) mit einem 6-fachen His-Tag eingebracht wurde. Wie zu sehen, konnten keinerlei Abbaubanden detektiert werden.

Abbildung 32: Nachweis der Expression von Neq014 in Membranen von *E. coli*. Expression in BL21 Star Zellen (Expressionsbedingung: 12 l 2YT Medium, 0,8 mM IPTG, Ernte nach Induktion üN bei 20 °C); Immunoblots mit Antikörper gegen den C-terminalen 6x Histidin-Tag am Protein.

Nachdem ein Screening für das nicht-codonoptimierte Konstrukt von Neq014 DDM als geeignetes Detergenz bestätigt hatte (siehe Abb. 30), wurde für die His-Tag Reinigung des codonoptimierten Proteins zunächst ebenfalls DDM verwendet. Die Reinigung erfolgte im Durchlauf-Verfahren (siehe 2.13.1) mit 0,1 % DDM im Reinigungspuffer. Nach Solubilisierung für 1 h bei RT mit 2 % (v/v) DDM in einem 20 ml Ansatz wurde das Solubilisat auf eine mit Nickel beladene HiTrap™ Chelating HP Säule aufgetragen. Der Auftrag sowie der erste Waschschrift (Wash 1) erfolgten wie beschrieben. Nach Optimierung konnten Imidazolkonzentrationen von 200 mM für den zweiten Waschschrift (Wash 2) sowie 450 mM für die Elution ermittelt werden. Der Verlauf der Reinigung wurde bei 280 nm verfolgt (Abb. 33 A). Die entsprechenden Proben wurden zur Kontrolle auf ein SDS-Gel aufgetragen (Abb. 33 B und C). Das Protein eluierte in einem relativ kleinen Peak mit einer anschließenden „Schulter“. Durch die beiden Waschschriffe wurden sehr viele unspezifisch gebundene Proteine entfernt. Im Eluat waren nahezu keine Verunreinigungen zu detektieren und es erschien die erwartete Bande auf Höhe von circa 27 kDa. Bei circa 55 kDa konnte durch Analyse mittels Western Blot ein weiteres Signal nachgewiesen

werden. Aus 10 mg/ml Gesamtprotein in einem Volumen von 20 ml, welches für die Solubilisierung eingesetzt wurde, konnte nach Konzentrierung des Eluats auf 500 µl Protein in einer Konzentration von 0,5 mg/ml gewonnen werden.

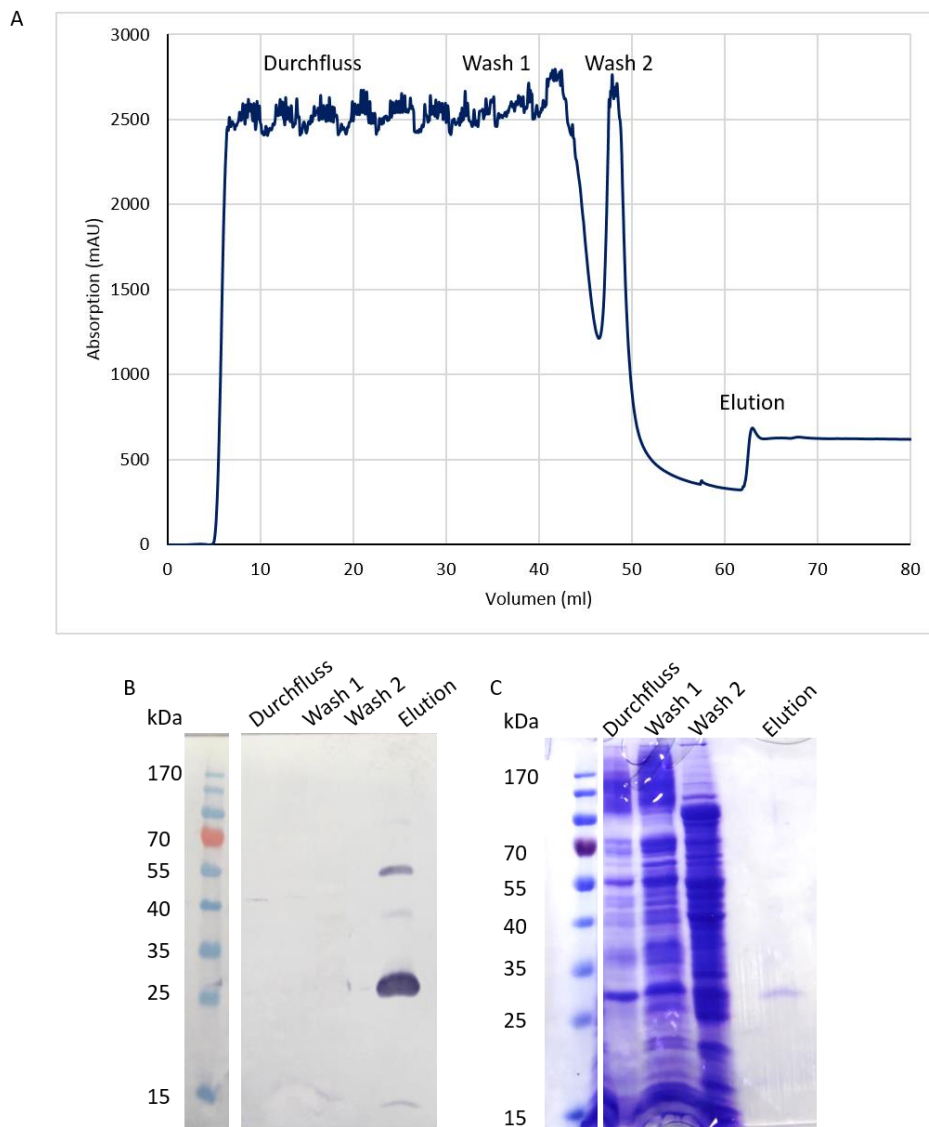


Abbildung 33: IMAC von Neq014 im Durchlauf-Verfahren. Die Solubilisierung erfolgte mit 2 % (v/v) DDM (A) Chromatogramm der IMAC (HiTrap™ Chelating HP Säule), Wash 1 mit 20 mM Imidazol, Wash 2 mit 200 mM Imidazol, Elution mit 450 mM Imidazol; blau (–): UV-Absorption bei 280 nm, (B) Immunoblot mit Antikörper gegen den C-terminalen 6x Histidin-Tag, (C) Coomassie-Färbung.

Für die Proteinkristallisation wurden die Proben ohne weitere Reinigungsschritte entsalzt und auf 3 mg/ml aufkonzentriert. Die Kristallisationsansätze wurden wie beschrieben (siehe 2.15) in 96-well Platten angesetzt. Dabei wurden fertige Screening-Lösungen des MemGold™ HT-96 Screens verwendet. Die Platten wurden bei 18 °C inkubiert und regelmäßig auf Kristallbildung überprüft. Nach einer Woche waren für eine Bedingung (70 mM NaCl, 50 mM Natriumcitrat, 22 % (v/v) PEG 400, pH 4,5) kleine Kristalle, die aus dem verwendeten Detergenz herauswuchsen, zu sehen (Abb. 34).

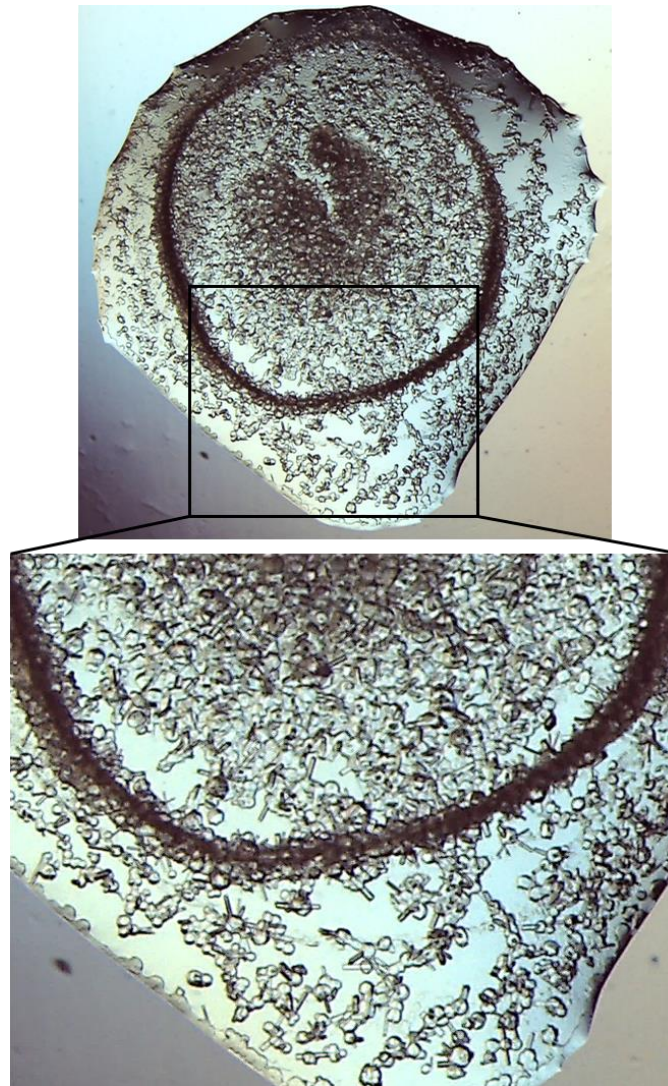


Abbildung 34: Proteinkristalle von Neq014. Das Protein wurde für 1 Woche mit 70 mM NaCl, 50 mM Natriumcitrat und 22 % (v/v) PEG 400 bei pH 4,5 inkubiert. Kristallisationstropfen 600 nl.

In ein paar anderen Bedingungen, die ebenfalls PEG 400, Natriumcitrat und NaCl (in unterschiedlichen Konzentrationen und bei unterschiedlichen pH Werten) enthielten, waren sogenannte Nanokristalle zu erkennen. Deshalb wurden 24-well Platten mit verschiedenen Variationen dieser Bedingungen angesetzt. Die Reservoirs der 24-well Platte wurden mit je 500 μ l verschiedener Kristallisationslösungen (genaue Zusammensetzung siehe Anhang 7F) befüllt. Die Kristallisationsansätze wurden ebenfalls bei 18 °C inkubiert und regelmäßig kontrolliert. Eine Kristallbildung konnte jedoch für keine der Bedingungen beobachtet werden. Auch die Reproduktion der Kristalle, welche bei einer Bedingung des 96-well Screens aus dem Detergenz heraus gewachsen waren, gelang nicht.

Da die Kristallbildung mit DDM als Detergenz scheinbar nur schlecht möglich und nicht reproduzierbar war, wurde ein erneuter Detergenz Screen durchgeführt (Abb. 35). Mit allen Detergenzien war eine

gute Solubilisierung (mindestens 60 %) möglich. Auffällig ist jedoch, dass DDM im Vergleich das schwächste Signal im Western Blot lieferte. DDM war für die Reinigung des exprimierten, nicht-codonoptimierten Konstrukts von Neq014 favorisiert worden.

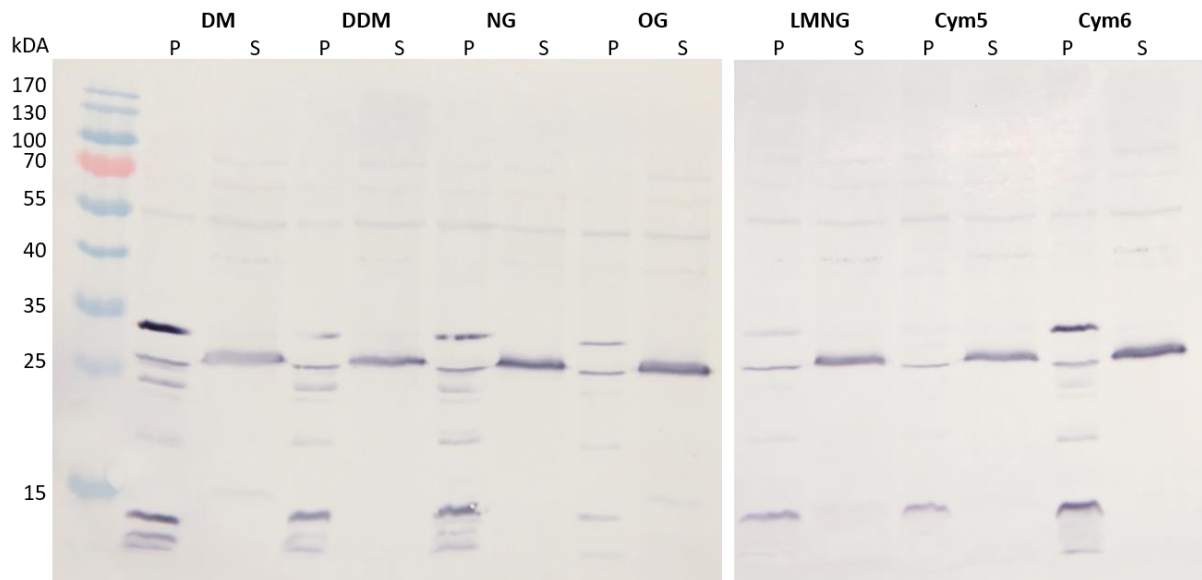


Abbildung 35: Solubilisierung von Neq014 (codonoptimiert) mit verschiedenen Detergenzien. Solubilisierung mit je 1,67 % Detergenz für 1 h bei RT. Im Vergleich wurden Pellet (P) und Solubilisat (S) nach der Ultrazentrifugation aufgetragen; Immunoblot mit Antikörper gegen den C-terminalen 6x Histidin-Tag am Protein.

Für eine erneute Reinigung von Neq014 im Durchlauf-Verfahren wurde Cymal 6 ausgewählt. Die Solubilisierung erfolgte in einem 20 ml Ansatz für 1 h bei RT mit 2 % (v/v) Detergenz. Der erste Waschschrift wurde mit 20 mM Imidazol, der zweite Reinigungsschritt mit 200 mM Imidazol und die Elution mit 450 mM Imidazol durchgeführt. Im Reinigungspuffer befanden sich 0,2 % (v/v) Cymal 6. Der Verlauf der Reinigung wurde bei 280 nm verfolgt (Abb. 36 A). Das Eluat wurde zur Kontrolle auf ein SDS-Gel aufgetragen (Abb. 36 B). Im Vergleich zur Reinigung mit DDM eluierte das Protein in einem monodispersen Peak und die Absorption bei 280 nm war deutlich höher. Auch in diesem Fall wurden durch die beiden Waschschriffe sehr viele unspezifisch gebundene Proteine entfernt. Im Eluat waren nahezu keine Verunreinigungen zu detektieren und die erwartete Bande auf Höhe von circa 27 kDa war eindeutig nachweisbar. Es traten lediglich zwei weitere Banden bei 55 und circa 85 kDa auf.

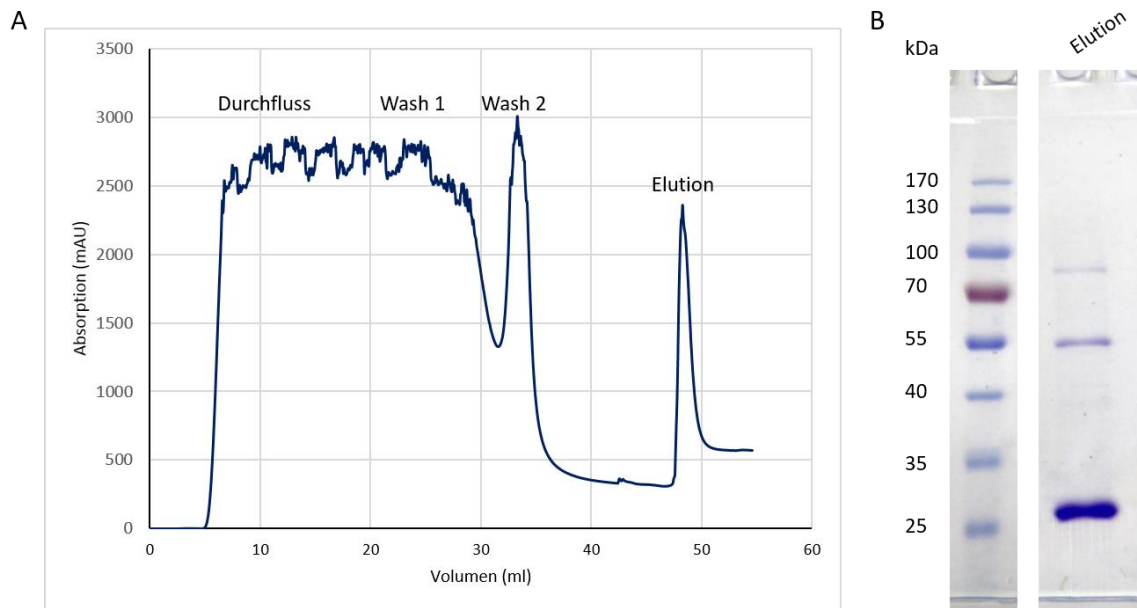


Abbildung 36: IMAC von Neq014 im Durchlauf-Verfahren. Die Solubilisierung erfolgte mit 2 % (v/v) Cymal 6. (A) Chromatogramm der IMAC (HiTrap™ Chelating HP Säule), Wash 1 mit 20 mM Imidazol, Wash 2 mit 200 mM Imidazol, Elution mit 450 mM Imidazol; blau (–): UV-Absorption bei 280 nm, (B) Comassie-Färbung des Eluats nach der Reinigung.

Aus 10 mg/ml Gesamtprotein in einem Volumen von 20 ml, welches für die Solubilisierung eingesetzt wurde, konnte nach Konzentrierung des Eluats auf 500 µl Protein in einer Konzentration von 2 mg/ml gewonnen werden. Dies entspricht der 4-fachen Menge einer DDM-Reinigung. Obwohl es bei beiden Detergenzien um nichtionische Maltoside mit nahezu identischen chemischen Eigenschaften handelt, konnten die Reinigung und die Proteinausbeute durch Cymal 6 deutlich verbessert werden. Folglich stand für weitere Versuche mehr Protein zur Verfügung.

Zur Kontrolle der Homogenität der eluierten Proteinprobe wurde im Anschluss eine Gelfiltration durchgeführt (siehe 2.14). Um zu überprüfen, ob das enthaltene Imidazol aus der vorangegangenen IMAC einen störenden Einfluss auf die Proteinqualität der Eluate hatte, wurden diese vor der Gelfiltration aufgeteilt. Eine Probe wurde unverändert für die SEC verwendet, der anderen Probe wurde vorher mittels PD10 Säule das Imidazol entzogen. Der SEC-Puffer enthielt 0,2 % (v/v) Cymal 6 und das Eluat wurde in Fraktionen zu je 0,5 ml aufgefangen. Die Chromatogramme der SEC für beide Proben (mit und ohne Imidazol) glichen sich exakt und auch die entsprechenden SDS-Gele wiesen keinerlei Unterschiede auf. Im Folgenden ist daher nur die Gelfiltration der Proteinprobe ohne Imidazol zu sehen (Abb. 37 A und B).

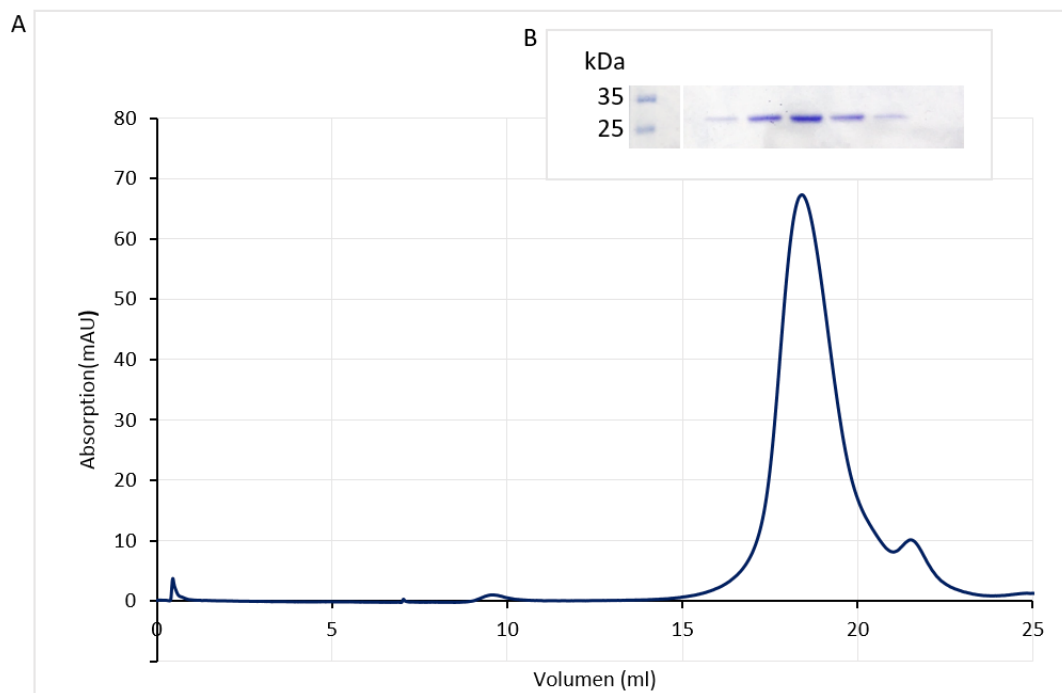


Abbildung 37: SEC von Neq014 (codonoptimiert). (A) Chromatogramm der SEC (Superose 6 10/300 GL), blau (—): UV-Absorption bei 280 nm, (B) SDS-PAGE der Proben nach der Gelfiltration.

Die proteinenthaltenden Fraktionen beider SEC-Ansätze wurden vereinigt, für die Kristallisation entsalzt und auf 10 mg/ml aufkonzentriert. Es wurden erneut Kristallisationsansätze mit fertigen Screening-Lösungen des MemGold™ HAT-96 Screens in 96-well Platten angefertigt. Die Platten wurden bei 18 °C inkubiert und regelmäßig auf Kristallbildung überprüft. Bis dato konnte jedoch nur erneut die Entstehung von Nanokristallen beobachtet werden (hier nicht gezeigt). Da diese aber wie bereits für DDM gereinigtes Protein zu beobachten, in Bedingungen, die PEG 400, Natriumcitrat und NaCl (in unterschiedlichen Konzentrationen und bei unterschiedlichen pH Werten) entstanden, wurden 24-well Platten mit verschiedenen Variationen dieser Bedingungen angesetzt. Die Reservoirs der 24-well Platte wurden mit je 500 µl verschiedener Kristallisationslösungen (genaue Zusammensetzung siehe Anhang 7F) befüllt. Die Kristallisationsansätze wurden ebenfalls bei 18 °C inkubiert und regelmäßig kontrolliert. Eine Kristallbildung konnte jedoch für keine der Bedingungen beobachtet werden.

Da in vorhergehenden Reinigungen im Eluat neben der erwarteten Monomerbande bei circa 27 kDa immer zwei weitere Banden bei 55 und circa 85 kDa auftraten, wurde vermutet, dass es sich dabei um die dimere bzw. trimere Konformation des Proteins handelt. Mitglieder der SLAC1 Familie und deren Homologe weisen ebenfalls eine trimere Struktur auf. Die beiden zusätzlichen Banden, die für Neq014 detektiert wurden, entsprachen ziemlich exakt dem zwei- bzw. dreifachen des Monomers (27 kDa). Um den Oligomerisierungszustand von Neq014 überprüfen zu können, wurde das Protein mit Native PAGEs (CNE und BNE, siehe 2.9.3) analysiert.

Nach der CNE (Abb. 38 A) konnte keine Aussage hinsichtlich nativer Proteinmasse oder Oligomerisierungszustand getroffen werden, da die Proteinproben nicht in das Gel einliefen und in der Tasche des Sammelgels zurück blieben. Proteine wandern in der CNE gemäß ihrem intrinsischen pI , da keine geladenen Verbindungen, die an die Proteine binden und eine Ladungsveränderung hervorrufen könnten, in den verwendeten Puffern enthalten sind. CNE-Gele weisen einen pH von 7,5 auf, Proteine mit einem $pI < 7,5$ wandern also zur Anode. Proteine mit einem $pI > 7,5$ wandern dementsprechend zur Kathode, laufen somit nicht in das Gel ein und gehen verloren. Der Kathodenpuffer der BNE unterscheidet sich vom CNE Kathodenpuffer nur durch die Zugabe von Comassie Blue G-250. Dieser anionische Farbstoff kann an die hydrophobe Oberfläche der Proteine binden und ruft dadurch eine Ladungsänderung hervor. Proteine mit einem intrinsischen $pI > 7,5$ wandern dabei zur Anode und können im Gel aufgetrennt werden. Schon scheinbar geringste Variationen des Kathodenpuffers haben also einen beträchtlichen Einfluss auf das Trennungsprinzip, die Auflösung und die generelle Nutzbarkeit der jeweiligen nativen Elektrophorese (Wittig *et al.*, 2010). Da der vorhergesagte pI von Neq014 bei 9,3 liegt, wurde dementsprechend eine BN-PAGE durchgeführt (Abb. 38 B).

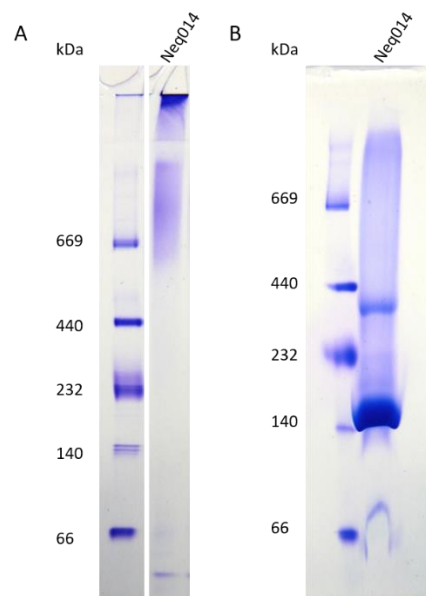


Abbildung 38: Native-PAGEs von Neq014 (codonoptimiert). Je 30 μg gereinigtes Protein nach der IMAC aufgetragen, Comassie-Färbungen, (A) CNE (5–13 %), (B) BNE (5–13 %).

Wie zu erwarten, konnte das Protein in das Gel einlaufen und es zeigte sich eine starke Bande auf Höhe von circa 140 kDa. Eine weitere, schwächere Bande unterhalb der 440 kDa Markierung, sowie eine schwache Bande etwas oberhalb der 66 kDa Markierung waren außerdem zu erkennen. Das Monomer von Neq014 hat eine vorhergesagte Größe von 35,8 kDa. Bei einer trimeren Struktur sollte im Nativgel eine Bande bei circa 107,4 kDa erscheinen. Eine Bande bei 140 kDa spricht eher für eine tetramere Struktur. Das Signal, das oberhalb der 66 kDa Markierung erschien, könnte hingegen das Dimer von

Neq014 darstellen (71,6 kDa). Allerdings wurde bereits festgestellt, dass die apparenten Molekulargewichte von manchen Proteinen in Abhängigkeit von verwendeten Lipiden, Detergenzien und dem Farbstoff (Comassie Blue G-250) um bis zu 60 kDa in einer BNE-PAGE variieren können (Crichton *et al.*, 2013). Dieser Massenunterschied geht also nicht mit dem Oligomerisierungszustand der Proteine einher, sondern spiegelt ein verändertes Laufverhalten während der Elektrophorese, bedingt durch assoziierte Detergenz(-Lipid)-Mizellen und dem verwendeten Comassie-Farbstoff, wieder. Da die gewonnenen Daten aus den SDS-Gelen für einen trimeren Zustand des Proteins sprechen, muss der tatsächlich vorliegende Oligomerisierungszustand durch weitere Experimente geklärt werden.

4 Diskussion

4.1 Analyse von Membranproteinen aus *I. hospitalis* und *N. equitans*

4.1.1 Bioinformatische Analysen

Am Anfang der Arbeit stand die Frage nach einem ATP/ADP Transport innerhalb einer *I. hospitalis* Zelle. Durch die ungewöhnliche Lokalisierung der energiekonservierenden Enzymkomplexe (H₂Schwefel-Oxidoreduktase und ATP-Synthase) in der äußeren Zellmembran (OCM) des Organismus, häuft sich im Intermembran-Kompartiment ATP an. Es wird zum Teil dort verbraucht (Mayer *et al.*, 2012; Flechsler, 2015), aber die Energie wird auch für die Informationsprozessierung im Cytoplasma benötigt. Dies erfordert einen Transport von ATP durch die innere Membran und einen Rücktransport von ADP und P_i aus dem Cytoplasma in das IMC. Im Genom von *I. hospitalis* lassen sich keinerlei Sequenzidentitäten zu den bisher bekannten ATP/ADP Translokasen (ACCs oder NTTs) feststellen. Die nicht-mitochondrialen Nukleotid-Transporter gehören der Familie der ADP/ATP-Antiporter an, welche entfernt mit der Major Facilitator Superfamilie verwandt ist (Saier *et al.*, 2006; Reddy *et al.*, 2011). Bioinformatische Analysen im Rahmen dieser Arbeit identifizierten neben den sechs annotierten MFS Transportern (Iho0302, Iho0391, Iho0409, Iho0555, Iho0800, Iho1008) zwei weitere Mitglieder dieser Superfamilie in *I. hospitalis* (Iho0298 und Iho1012). Hypothetisch eingestufte Proteine in *I. hospitalis* benötigen ausführliche bioinformatische und biochemische Untersuchungen, um eine Funktion zuordnen zu können (Heimerl, 2014; Flechsler 2015). Bei der Annotation archaeeiler Membranproteine ist dies nicht trivial, da viele der physiologischen Prozesse unbekannt sind. Bioinformatische Untersuchungen von Transportproteinen sind daher äußerst wichtig. Da *I. hospitalis* der einzige bekannte Wirt für *N. equitans* ist und *Nanoarchaeum* energetisch und metabolisch von *I. hospitalis* abhängt sind Transportvorgängen zwischen den beiden Organismen von großem Interesse.

4.1.1.1 Analyse verschiedener Membranproteine von *I. hospitalis*

Wie sich bereits aus der Zusammenstellung der Daten der TransportDB ergab (Tab. 1), stellen die MFS Proteine in allen Domänen des Lebens die größte Superfamilie innerhalb der sekundären Transporter dar. In *I. hospitalis* konnten acht putative MFS Transporter identifiziert werden. Alle anderen hier ausgewählten Membranproteine von *I. hospitalis* waren für eine heterologe Expression und eine anschließende Charakterisierung von großem Interesse, da sie evolutionär und funktionell bedeutenden Proteinfamilien zugeordnet werden konnten. Für manche Kandidaten gibt es außerdem

bis dato keine Kristallstrukturen, was der Arbeit mit diesen Proteinen einen zusätzlich Anreiz verlieh. Iho0192 ist als Kationentransporter annotiert und gehört vermutlich der K^+ -Transporter (Trk) Familie an. Mitglieder dieser Familie vermitteln in Prokaryoten die aktive Aufnahme von Kaliumionen und haben sich vermutlich durch multiple Genduplikationen oder Fusionen aus einfachen K^+ -Kanälen entwickelt. K^+ liegt in allen lebenden Zellen in hoher Konzentration vor und hat vor allem für die Physiologie der Zellen große Bedeutung. Kaliumionen sind für die Etablierung des Membranpotentials, die Regulation des Turgordrucks und die Aufrechterhaltung des intrazellulären pH-Wertes wichtig. Da die Zellmembran aber nahezu undurchlässig für K^+ ist, haben sich spezifische Transporter entwickelt, um die Aufnahme von Kalium zu ermöglichen (Cao *et al.*, 2011). In *I. hospitalis* könnte ein Kaliumtransporter beispielsweise an der Regulation des internen pH-Wertes beteiligt sein. Zur Aufrechterhaltung eines osmotischen Gleichgewichtes könnte er auch der internen Kommunikation zwischen den Kompartimenten dienen.

Das als Na^+ /Solut Symporter annotierte Protein Iho0454 ist vermutlich der Familie der Solut:Sodium Symporter (SSS) zugehörig, deren Mitglieder in allen drei Domänen des Lebens zu finden sind und den Symport von Natriumionen in Verbindung mit Soluten katalysieren. Die transportierten Solute können je nach System entweder Zucker, Aminosäuren, organische Kationen wie Cholin, Nukleoside, Inositol, Vitamine, Harnstoff oder Anionen sein (Wright *et al.*, 2004). Zu den am besten charakterisierten Transportern zählen neben vSGLT von *V. parahaemolyticus*, die Glukose- (SGLT) und Jodidsymporter (NIS) aus Säugetieren (Hediger *et al.*, 1987; Dohán *et al.*, 2003) sowie der Prolinsymporter PutP von *E. coli* (Jung *et al.*, 2012). *I. hospitalis* kann in geringen Mengen organische Säuren wie Acetat, Pyruvat oder Succinat aufnehmen (Jahn *et al.*, 2007). Es wäre denkbar, dass der Transport dieser Stoffe über den putativen Na^+ /Solut Symporter Iho0454 erfolgt.

Eine annotierte Aminosäure Permease, Iho0573, gehört wahrscheinlich der Aminosäure/Polyamin/Organokation (APC) Superfamilie an. APC Transporter umfassen Solut:Kationen Symporter, aber auch Solut:Solut Antiporter (Saier, 2000; Schweikhard und Ziegler, 2012). Sie sind wesentlich an der Nährstoffaufnahme, dem Recycling von Neurotransmittern, der ionische Homöostase sowie der Regulation des Zellvolumens beteiligt (Shaffer *et al.*, 2009). Der AdiC Transporter von *E. coli* (3LRC; Gao *et al.*, 2009) verbindet den Import von Arginin mit einem Export von Agmatin, der ApcT aus *M. jannaschii* (3GIA; Shaffer *et al.*, 2009) transportiert ein breites Spektrum an Aminosäuren und koppelt deren Aufnahme an ein oder mehrere Protonen. Da bisher nicht bekannt ist, wo die Aminosäuresynthese innerhalb einer *I. hospitalis* Zelle stattfindet, die Proteinbiosynthese aber z.B. im Cytoplasma abläuft, wäre ein Transport von Aminosäuren zwischen den Kompartimenten denkbar.

Das hypothetische Protein Iho1222 wurde als putativer Chloridkanal mit zwei CBS-Domänen identifiziert. Homologe Strukturen fanden sich in der ubiquitären Chlorid Carrier/Kanal (ClC) Familie.

Genau wie andere Ionenkanäle spielen Chloridkanäle für den Aufbau transmembraner Ionengradienten, die wiederum für viele verschiedene Prozesse in der Zelle benötigt werden, eine wichtige Rolle. In der ClC Familie sind sowohl H^+ -gesteuerte Chloridkanäle als auch H^+/Cl^- oder H^+/NO_3^- Antiporter zu finden (Accardi und Picollo, 2010). Gut charakterisiert sind vor allem die Chloridkanäle in Säugetieren. Diese sind unter anderem für die elektrische Erregung der Skelettmuskeln sowie für den Transport von Salz und Wasser in den Epithelzellen der Niere verantwortlich und werden oft mit Erkrankungen assoziiert (Dutzler *et al.*, 2002). Strukturen konnten bereits für den EriC von *E. coli* (1KPK; Dutzler *et al.*, 2002) sowie einen eukaryotischen Chloridkanal einer Rotalge der Gattung *Rhodophyta* (3ORG; Feng *et al.*, 2010) gelöst werden. Iho1222 enthält vermutlich zwei CBS-Domänen. Diese Domänen treten paarweise auf, besitzen eine konservierte Sequenz und wurden nach einem Protein in dem sie gefunden wurden, der Cystathionin-beta-Synthase (CBS; Bateman, 1997), benannt. Außerdem wurden CBS-Domänen in Mg^{2+} Transportern, Proteinkinasen und in Chloridkanälen identifiziert (Mindell und Maduke, 2001). Wahrscheinlich besitzen die Domänen eine regulatorische Funktion. Es konnte bereits gezeigt werden, dass sie in die Bindung von Liganden wie AMP, ATP oder S-Adenosylmethionin involviert sind (Janosik *et al.*, 2001). Durch den Aufbau eines Ionengradienten könnte ein Chloridkanal in *I. hospitalis* sekundär aktive Transportvorgänge ermöglichen. Auch eine Beteiligung an der Regulation des intrazellulären pH-Wertes ist denkbar. Dies ist für die ATP-Syntheseaktivität von großer Bedeutung. Da der pH-Wert im Medium für optimales Wachstum bei 5,5–6,0 liegt, müsste im IMC ein alkalischer pH-Wert (8,5–9,0) herrschen, um den notwendigen pH-Gradienten an der äußeren Zellmembran aufzubauen (Kreuter, 2015).

Für das SNARE assoziierte Golgi Protein Iho1083 wurden nach Sequenzalignments (PSI-BLAST) unter anderem Homologe der DedA Familie aus Gram-positiven Bakterien in den Datenbanken identifiziert. Der Name stammt von einem *dedA* Gen aus *E. coli*, da dieses in der DNA Sequenz zwischen den Genen *hisT* und *purF* liegt (*downstream [of hisT] E. coli DNA gene A*; Nonet *et al.*, 1987). Bisher konnte noch keine Proteinstruktur von Mitgliedern dieser Familie gelöst werden. Deswegen ist die genaue biologische Funktion immer noch nicht geklärt. Allerdings konnte gezeigt werden, dass Mutationen in bakteriellen DedA Proteinen mit Zellteilungsdefekten, Temperatursensitivität, veränderter Lipidzusammensetzung der Membran und dem Verlust der protonenmotorischen Kraft einhergehen (Doerrler *et al.*, 2013). DedA Proteine scheinen also eine wichtige Rolle in der Homöostase biologischer Membranen einzunehmen. In den Datenbanken werden Mitglieder dieser Familie, wie auch Iho1083, oft als Proteine mit „SNARE-assoziierten“ Domänen oder als SNARE-assoziierte Golgi Proteine bezeichnet. Dies ist auf eine Studie zurückzuführen, in welcher eine Assoziation des Proteins Tvp38 von *S. cerevisiae* mit einem SNARE Protein aus dem Golgi-Apparat festgestellt wurde (Inadome *et al.*, 2007). SNARE-Proteine (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor*) bilden

Komplexe in Vesikeln eukaryotischer Zellen. Sie sind in verschiedenen Organellen wie z.B. dem Golgi Apparat zu finden und vermitteln im Wesentlichen die Vesikelfusion (Lowe *et al.*, 1997). Tvp38 ist ein Homolog zu einem DedA Protein von *E. coli* und bedingt durch die Studie von Inadome *et al.* wurde vermutet, dass es in bestimmte Vorgänge im Golgi-Apparat und in Endosomen involviert ist. Die funktionelle Signifikanz dieser Interaktion ist aber noch nicht geklärt, zeigt aber, dass Mitglieder der DedA Familie in Eukaryoten eine Rolle im Sekretionsweg spielen. Da auch in *I. hospitalis* Vesikel gebildet werden bzw. ein endogenes Membransystem beobachtet wurde (Heimerl, 2014), könnte das putative SNARE assoziierte Golgi Protein Iho1083 z.B. an verschiedenen Fusionsprozessen dieser Strukturen beteiligt sein.

Auch für den Auxin Efflux Carrier Iho1095 ließen sich keine gelösten homologen Kristallstrukturen finden. Proteine der Auxin Efflux Carrier (AEC) Familie sind hauptsächlich in pflanzlichen Geweben wie den Leitbündeln zu finden. Sie vermitteln den polaren (abwärts gerichteten) Auxintransport von den Blättern zu den Wurzeln (Reinhardt *et al.*, 2003). Prokaryotische Homologe sind aber auch in Bakterien (z.B. *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Aquifex aeolicus*, *Bacillus subtilis*, *Rickettsia prowazekii*) und Archaeen (z.B. *Methanocaldococcus jannaschii*, *Methanothermobacter thermoautotrophicus*) entdeckt worden. Das Protein McdF von *K. pneumoniae* wurde dabei in Verbindung mit der Aufnahme von Malonat gebracht (Hoenke *et al.*, 1997), MleP von *Oenococcus oeni* fungiert als Malat Permease (Costantini *et al.*, 2011). Ob *I. hospitalis* Malat aus der Umgebung aufnehmen kann ist unbekannt, da bisher nur chemische Präkursoren wie Succinat, Acetat und Pyruvat getestet wurden.

4.1.1.2 Analyse eines Membranproteins von *N. equitans*

Von den zehn annotierten Transportern im Genom von *N. equitans* wurde das als C₄-Dicarboxylat Transporter hinterlegte Protein Neq014 für strukturelle Untersuchungen ausgewählt.

C₄-Dicarboxylat Transporter sind in verschiedenen Organismen zu finden. Das Mae1 Protein von *Schizosaccharomyces pombe* beispielsweise dient der Aufnahme von Malat (Grobler *et al.*, 1995). In *E. coli* und *H. influenzae* können Tellurit-Resistenz Transporter (TehA) gefunden werden (Walter *et al.*, 1991; Fleischmann *et al.*, 1995). Andere Homologe sind als Sulfit Efflux Pumpen (Ssu1 von *S. cerevisiae*) oder allgemein als Dicarboxylat Transporter (TDT) charakterisiert worden (Park und Bakalinsky, 2000). Neq014 weist nicht nur Ähnlichkeiten zu C₄-Dicarboxylat Transportern von Bakterien und Pilzen, sondern auch zu spannungs-abhängigen Anionenkanälen (SLAC1 Familie), die in Pflanzen zu finden sind, auf. Die biologische Funktion der Mitglieder der SLAC1 (Slow Anion Channel-associated 1) Familie ist evolutionär konserviert und besteht im Wesentlichen in der Aufrechterhaltung der Zellhomöostase. Pflanzen regulieren ihren Gasaustausch mit der Umgebung über Poren in der Blattepidermis. Die sogenannten Stomata lassen CO₂, welches für die Photosynthese benötigt wird, in die Blätter gelangen und gleichzeitig Wasser entweichen. Verschiedene Stimuli wie Lichtintensität, CO₂-Konzentration und

Wasserversorgung beeinflussen die Öffnungsweite dieser Poren, die über zwei Schließzellen reguliert werden. Wassermangel führt zum Beispiel zu einer Signaltransduktion durch das Phytohormon ABA (Abscisinsäure), wodurch Kanäle geöffnet werden, die Anionen (Cl^- , NO_3^- , Malat²⁻) aus den Schließzellen hinaus strömen lassen. Der daraus resultierenden Verringerung des osmotischen Drucks in der Zelle folgt ein Ausstrom von Wasser, die Schließzellen schrumpfen und die Stomata werden geschlossen (Schroeder und Hedrich, 1989). Der entscheidende Schritt dabei ist die Aktivierung von Anionenkanälen. Es gibt zwei Anionenkanaltypen, die R-Typ (rapid type) und die S-Typ (slow type) Anionenkanäle (Hedrich *et al.*, 1990). Die spannungsabhängige Aktivierung bzw. Deaktivierung liegt für R-Typ Anionenkanäle im Bereich von Millisekunden, für S-Typ Anionenkanäle im Bereich von zehn Sekunden. SLAC1 konnte als S-Typ Anionenkanal in *Arabidopsis* identifiziert und beschrieben werden (Negi *et al.*, 2008). Darüber hinaus gibt es in Pflanzen noch vier weitere SLAC1 Homologe, die als SLAH 1-4 bezeichnet werden. Durch die Strukturbestimmung des Tellurit-Resistenz Proteins TehA von *Haemophilus influenzae* (3M71), ein entfernt verwandtes Homolog von SLAC1 (19 % Sequenzidentität), konnte außerdem ein Homologiemodell erstellt werden (Chen *et al.*, 2010). Das SLAC1 Monomer besteht aus insgesamt zehn Transmembran- α -Helices und fünf dieser Helices formen eine Pore. Ein darin zu findender, konservierter Phenylalaninrest ist in den Gating-Mechanismus involviert. Je drei Monomere lagern sich zusammen, so dass eine „Tripel-Fass“-Struktur für SLAC1 entsteht.

Mitglieder der SLAC Familie spielen gerade bei osmotischem Stress eine entscheidende Rolle. In dem Zusammenhang ist es sehr interessant, dass es in *N. equitans* neben Neq014 trotz der geringen Genomgröße von 0,49 Mbp auch zwei annotierte mechanosensitive Kanäle gibt (Waters *et al.*, 2003). Mechanosensitive Kanäle dienen ebenfalls bei osmotischem Stress als eine Art „Notfallventil“. Durch Öffnung dieser Poren können niedermolekulare Substanzen (Ionen, Aminosäuren, Trehalose, Betain u. ä.) aus dem Cytoplasma in die Umgebung entlassen werden, um so die Osmolalität des Cytoplasmas schnell verringern zu können und ein Platzen der Zellen durch Wassereinstrom zu verhindern (Morbach und Krämer, 2000). In der engen Lebensgemeinschaft von *N. equitans* und *I. hospitalis* könnten mechanosensitive Kanäle bzw. ein spannungsabhängiger Anionenkanal wie Neq014 beispielsweise eine Rolle bei Verlust des Kontaktes zur Wirtszelle spielen. Durch Transportvorgänge zwischen den beiden Organismen könnte es außerdem zu Struktur- und Konzentrationsänderungen kommen, die eventuell durch entsprechende Kanäle auf Seiten von *N. equitans* kompensiert werden müssen. Ein spannungsabhängiger Anionenkanal könnte in *N. equitans* eine entscheidende Rolle für die Regulation des Metaboliten- bzw. Energieflusses über die Membran spielen. Neq014 könnte beispielsweise in den Transport von ATP, ADP, Chlorid, Nitrat, Malat oder anderer Metabolite

involviert und somit für die Kommunikation mit verschiedenen Enzymen des Stoffwechsels verantwortlich sein.

Auf der Grundlage der Struktur von TehA aus *Haemophilus influenzae* (3M71; Chen *et al.*, 2010) wurde ein elektrostatisches Oberflächenpotential für Neq014 erstellt (Abb. 39).

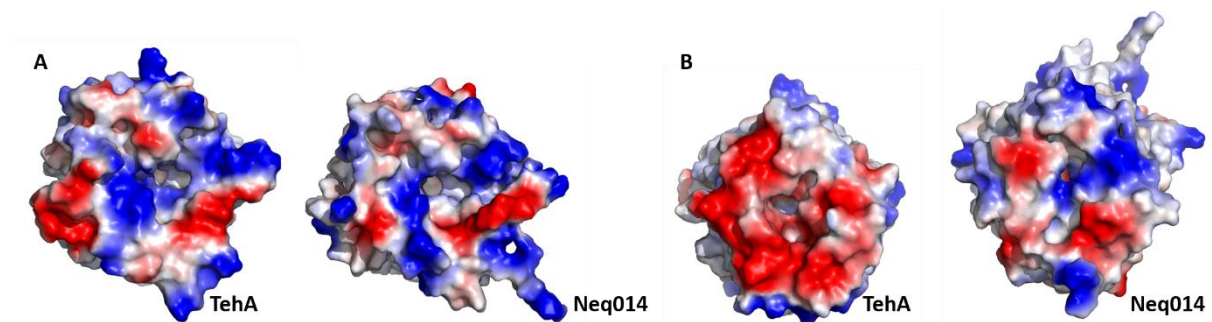


Abbildung 39: Elektrostatisches Oberflächenpotential von Neq014 und TehA. Für die Erstellung des Modells von Neq014 wurde TehA von *H. influenzae* (3M71) als Vorlage verwendet. Eine Seite der beiden Proteine (A) scheint bezüglich der Ladungsverteilung mehr oder weniger ähnlich zu sein, die gegenüberliegende Seite (B) ist nur im Fall von TehA stark negativ geladen. Rote und blaue Bereiche kennzeichnen entsprechend negative und positive Ladungen.

Dieses erste Modell zeigt, dass die Ladungsverteilung auf der cytoplasmatischen Seite der beiden Proteine mehr oder weniger ähnlich zu sein scheint (Abb. 39 A). Die gegenüberliegende Seite ist im Fall von TehA sehr stark negativ geladen. Für Neq014 sind sowohl negative als auch positive Ladungsbereiche zu sehen (Abb. 39 B). Dies könnte Hinweise bezüglich der Substratspezifität von Neq014 geben. Der hauptsächlich elektropositive Charakter der intrazellulären Seite von TehA trägt wahrscheinlich zum Anionenefflux bei (Chen *et al.*, 2010).

4.1.2 Heterologe Expression und Reinigung

Erster Schritt zur Untersuchung ausgewählter Membranproteine von *I. hospitalis* (siehe Tab. 2) war deren heterologe Expression, da bis dato kein homologes System zur Verfügung steht. Weil zu Beginn dieser Arbeit noch keine Membranproteine von *I. hospitalis* kloniert und exprimiert worden waren (lösliche Proteine mit nur mäßigem Erfolg in *E. coli*), bestand die wesentliche Aufgabe zunächst darin, ein effizientes Expressionssystem zu finden und zu etablieren. Dabei wurden sowohl verschiedene prokaryotische (*E. coli*, *P. furiosus*, *T. kodakarensis*) als auch eukaryotische (*P. pastoris*, Sf9) Systeme getestet. Auch für Proteine von *N. equitans* war bisher kein heterologes Expressionssystem etabliert. In diesem Fall konnte das *E. coli* System verwendet werden.

4.1.2.1 Heterologe Expression in *E. coli*

Jede Aminosäure wird von mindestens einem Codon verschlüsselt, zum Teil können aber sogar bis zu sechs verschiedene Codons für ein und dieselbe Aminosäure kodieren. Jeder Organismus nutzt für die Bildung seiner Aminosäuren bestimmte Codons mit unterschiedlicher Häufigkeit, was als Codon Usage (wörtlich Codongebrauch) bezeichnet wird (Gustafsson *et al.*, 2004). Gemäß der Codon Usage Database gibt es mehrere Codons die von *E. coli* für die Bildung verschiedener Aminosäuren (Arginin, Cystein, Isoleucin, Leucin, Prolin, Glycin, Serin und Threonin) nur sehr selten genutzt werden. Gerade diese „rare“ Codons werden jedoch häufig in Archaeen verwendet. Dies kann also einen möglichen Grund für den Misserfolg bei der Expression von archaeellen Membranproteinen in *E. coli* darstellen und niedrige Expressionsraten, eine frühzeitige Termination der Translation oder den Einbau falscher Aminosäuren erklären (Kim und Lee, 2006). Gerade in Clustern auftretende „rare“ Codons am 5' Ende eines Gens bereiten bei der heterologen Expression in *E. coli* Schwierigkeiten (Rosenberg *et al.*, 1993; Goldman *et al.*, 1995), welche meist nur durch Genmodifikationen und Verwendung spezieller Expressionsstämme umgangen werden können.

Ein Vergleich der Codon Usage von *E. coli* und *I. hospitalis* ergab einen durchschnittlichen Unterschied von 50,53 % (Wiegmann, 2013). Deshalb wurde für einige Membranproteine eine Codonoptimierung für die Expression in *E. coli* durchgeführt. Es konnte jedoch festgestellt werden, dass es keine Rolle spielte, ob eine Codonoptimierung durchgeführt wurde oder nicht. Eine heterologe Überexpression war für keines der Konstrukte möglich. Auch durch die Verwendung des speziellen Expressionsstammes Rosetta™ 2, welcher entsprechende tRNAs für die seltenen Codons AGA, AGG, AUA, CUA, GGA, CCC und CGG bereitstellt, konnte kein Erfolg erzielt werden.

Nach einer MALDI-TOF Analyse einer Proteinbande mit einem apparenten Molekulargewicht von 25 kDa, die nach Expressionen immer wieder im Western Blot nachgewiesen werden konnte (His-Tag Antikörper) zeigte sich, dass es sich dabei um OmpA (*outer membrane protein A*) von *E. coli* handelte. OmpA ist eines der Hauptproteine in der äußeren Membran von *E. coli* und dient im Wesentlichen der Strukturhaltung der Zellen. Darüber hinaus zeigen Δ OmpA Mutanten erhöhte Sensitivität gegenüber Umwelteinflüssen und osmotischem Stress, was zu der Annahme führt, dass OmpA dem Überleben von *E. coli* unter Stressbedingungen dient (Wang, 2002). Die heterologe Expression von Membranproteinen stellt eine solche Stresssituation dar. Die Zellen müssen rekombinantes Protein in großen Mengen synthetisieren, was wichtige Ressourcen und Energie kostet, die aber auch für zelleigene Prozesse, wie Wachstum und Vermehrung, benötigt werden (Bill und von der Haar, 2015). Zudem können überexprimierte Membranproteine die Membran der Wirtszelle destabilisieren und dadurch toxisch wirken. Aus diesem Grund stehen für die Überexpression von Membranproteinen auch spezielle Expressionsstämme, die sogenannten „Walker strains“ C41(DE3) und C43(DE3), zur

Verfügung (Miroux und Walker, 1996). Diese weisen mindestens eine nicht charakterisierte Mutation auf, welche den Zelltod, der in Verbindung mit der Expression von vielen rekombinanten toxischen Proteinen einhergeht, verhindert. Daher werden auch bevorzugt Membranproteine in den beiden Stämmen exprimiert. Der *E. coli* Stamm BL21(DE3) pLysS produziert auf seinem Plasmid ein T7 Lysozym, welches die basale Expression des Gens von Interesse reduziert, wodurch wiederum die Expression von toxischen Genen ermöglicht werden soll. Alle drei Spezialstämme wurden für Membranproteine von *I. hospitalis* getestet, konnten aber den Expressionserfolg nicht positiv beeinflussen. Doch nicht nur die Expressionsstämme (BL21 (DE3), BL21 Star™ (DE3), BL21(DE3) pLysS, Rosetta™ 2 (DE3), C41 (DE3), C43 (DE3) ΔAcrB) wurden für die unterschiedlichen Konstrukte variiert, sondern auch unterschiedliche Expressionsbedingungen wie zum Beispiel Temperatur, Induktionszeitpunkt, Konzentration des Induktors oder Wachstumsdauer. Diese systematischen Optimierungsmaßnahmen lieferten jedoch ebenfalls keine positiven Ergebnisse.

Da häufig auch die Auswahl des Plasmids einen Einfluss auf den Expressionserfolg hat, wurden verschiedene Vektoren eingesetzt. Die meisten der hier verwendeten Plasmide sind Standardvektoren für die Expression in *E. coli* (pET, pBAD, pTTQ). Unterschiede gibt es hinsichtlich des Promotors und des Affinitäts-Tags. Promotoren sollten in erster Linie stark sein, ein niedriges basales Expressionslevel aufweisen und die Induktion muss möglichst einfach und kostengünstig durchzuführen sein (Terpe, 2006). Starke Promotoren sind in der Lage die RNA-Polymerasen schnell und in hoher Anzahl an den Promotor zu rekrutieren. Somit wird ein ebenso schneller Transkriptionsstart ermöglicht. Niedrige basale Expressionslevel, die z.B. durch strenge Regulierung des Promotors erreicht werden, ermöglichen es, die Bakterien ungehindert zu hohen Zelldichten zu kultivieren, um dann sofort nach Zugabe des Induktors die Expression des Zielproteins einzuleiten. Man erhält somit hohe Gesamtproteinmengen, ohne das Zielprotein jedoch in den einzelnen Zellen zu sehr anzureichern, was wiederum für die Expression von toxischen Proteinen von Vorteil sein kann. Auch über die Konzentration des Induktors kann die Stärke der Expression entsprechend reguliert werden. Dies gilt vor allem für den durch L-Arabinose induzierbaren *araB*-Promotor, der in pBAD Vektoren genutzt wird (Guzman *et al.*, 1995). Gene, die unter Kontrolle dieses Promotors stehen, weisen eine geringe basale Expressionsrate auf. Durch Verwendung von Glukose im Expressionsmedium kann der Promotor noch zusätzlich reprimiert werden. Das pET Vektorsystem (Studier und Moffatt, 1986) nutzt den starken T7-Promotor. An diesen kann nur die T7-RNA-Polymerase, welche durch IPTG induziert werden kann, binden. Der T7-Promotor ist somit auch regulierbar, allerdings wird die T7-Polymerase ohne die Zugabe von IPTG in sehr geringen Mengen synthetisiert, was zu einer basalen Expression des Zielproteins führt. Um dieses Problem zu umgehen, wurde auf den pET-Vektoren ein Repressorgen (*lacI*) eingefügt. Zusätzlich können bestimmte Expressionsstämme (pLysS) verwendet werden, die auf

ihrem Plasmid für ein T7 Lysozym (Inhibitor der T7-Polymerase) codieren. Einen anderen starken Promotor, den *tac*-Promotor, nutzen pTTQ Vektoren. Dieser synthetische Promotor ist eine IPTG-induzierbare Variante des *lac*- und des *trp*-Promoters von *E. coli* und weist eine hohe Transkriptions-Initiationsaktivität auf (de Boer *et al.*, 1983). Alle in dieser Arbeit selbst hergestellten rekombinanten Plasmide führten zu positiven Klonen, mit Ausnahme der Konstrukte, die in den pBAD Vektor kloniert wurden. Aus diesem Grund konnten keine Arabinose induzierten Expressionen getestet werden. Für die Konstrukte im pET-26b(+) konnte nur für drei MFS Proteine (Iho0800, Iho0302 und Iho1008) eine positive Expression nachgewiesen werden. Allerdings war dieses Ergebnis aus unbekannten Gründen nicht reproduzierbar.

Alle in dieser Arbeit verwendeten Vektoren vom Typ pET, pBAD oder pTTQ hatten einen N- oder C-terminalen His-Tag, der sowohl der Detektion der Zielproteine im Western Blot als auch der Aufreinigung mittels IMAC diene. Das Plasmid pTTQ18_GFP verfügte über einen zusätzlichen GFP-Tag, welcher als Indikator für die stabile Faltung des Zielproteins dient. Denn nur wenn das Membranprotein exprimiert, korrekt gefaltet und in die Membran des Expressionswirts integriert wird, wird auch das GFP richtig gefaltet und kann fluoreszieren (Drew *et al.*, 2006). Ein weiterer Vorteil der Fusion mit GFP ist die Visualisierung des Zielproteins zu jeder experimentellen Phase, von der Expression bis hin zur Reinigung. Die Detektionsgrenze von GFP liegt dabei im Nanogramm Bereich, es werden also nur geringe Proteinmengen für einen Nachweis benötigt. Da außerdem In-Gel Fluoreszenzmessungen durchgeführt werden können, müssen keine zeitaufwändigen Western Blots, wie z.B. für His-Tag Fusionen nötig, gemacht werden. Die Expression von Iho0391 im Plasmid pTTQ18_GFP führte zwar zu nachweisbarem Protein, allerdings zeigten sich auch nach der Reinigung zahlreiche Banden im SDS-Gel. Bedingt durch eine Aggregation des Proteins kam es vermutlich zu einem proteolytischen Abbau.

Zuletzt wurde der spezieller Vektor pET-28a(+)_MISTIC, der N-terminal die Sequenz des sogenannten Mistic-Proteins enthält, für die Expression in *E. coli* getestet. Für die Klonierung in dieses Plasmid wurde das codonoptimierte Gen der putativen Aminosäure-Permease, Iho0573, verwendet. Mistic (Membrane-integrating Sequence for Translation of Integral Membrane Protein Constructs) ist ein ungewöhnliches integrales Membranprotein von *B. subtilis*, welches sich autonom in die Membran einbaut und dabei vorhandene zelluläre Translokationssysteme umgeht (Roosild *et al.*, 2005). Neu synthetisierte Proteine, die für die Sekretion oder die Membraninsertion bestimmt sind, werden selektiv zu den Translokationssystemen in der Cytoplasmamembran gelenkt. Signalsequenzen spielen für dieses Targeting und die Membraninsertion von Proteinen in Pro- und Eukaryoten eine entscheidende Rolle. Die kurzen Peptide (meist 15–20 AS) befinden sich in der Regel am N-Terminus eines Proteins. Das charakteristische Merkmal aller Signalsequenzen ist ihre dreigeteilte Struktur,

bestehend aus einem positiv geladenen N-Terminus (N-Region), einem hydrophoben Kern aus 7–15 Aminosäuren (H-Region) und einem polaren C-Terminus (C-Region), welcher oftmals Glycin- und Prolinreste enthält (von Heijne, 1985). Nach der Sekretion und Insertion des Zielproteins in die Membran können die Signalpeptide von membrangebundenen Signalpeptidasen abgespalten werden (Martoglio und Dobberstein, 1998). Die Translokation von Proteinen durch die Membran verläuft in Pro- und Eukaryoten nach einem ähnlichen Mechanismus. In Gram-negativen Bakterien können Proteine in die innere Membran, das Periplasma und die äußere Membran transportiert werden. In Eukaryoten gibt es zusätzlich viele intrazelluläre Membransysteme, die Organellen, in welche Proteine transloziert werden müssen. In *E. coli* gibt es mindestens drei unterschiedliche Sekretionssysteme. Durch das Sec-System werden ungefaltete Polypeptide mit einer entsprechenden Signalsequenz cotranslational über den Sec-Komplex in der Cytoplasmamembran transportiert. Dies kann sowohl mit Hilfe eines Signalerkennungspartikel (Signal Recognition Particle = SRP) als auch ohne ablaufen. Der SRP-abhängige Pfad benötigt SRPs im Cytoplasma als Hilfsproteine. Das Tat-System (twin arginine translocation) transportiert Proteine im gefalteten Zustand (Agarraberes und Dice, 2001). Auf Grund fehlender oder abweichender Signalsequenzen werden Membranproteine anderer Organismen von den Sekretionssystemen in *E. coli* häufig nicht erkannt. Im anderen Fall ist es auch möglich, dass die Translokation der überexprimierten Zielproteine zur Toxizität führt, da sie in Konkurrenz mit der Translokation zelleigener, vitaler Membranproteine steht. Wird ein Membranprotein aber an das Mistic Protein fusioniert, können diese beiden Nachteile umgangen werden. Allerdings verlief die Expression von Iho0573 nach Klonierung in das spezielle Plasmid pET-28a(+)_MISTIC negativ.

Ob die Signalpeptide der *I. hospitalis* Proteine generell ein Problem für die Expression in *E. coli* darstellen, lässt sich nicht eindeutig sagen. Nur für ein paar der hier ausgewählten Membranproteine von *I. hospitalis* wurden überhaupt Signalpeptide vorhergesagt (siehe Tab. 2). Es gibt Vermutungen, dass die An- bzw. Abwesenheit von einer Signalsequenz mit der Lokalisierung in der inneren bzw. äußeren Zellmembran von *I. hospitalis* korreliert. Eine andere Überlegung führt in Richtung *N. equitans*. Da *I. hospitalis* der einzig bekannte Wirt für *N. equitans* ist, wurde spekuliert, ob Membranproteine, die Signalpeptide aufweisen, in irgendeiner Weise mit Transportprozessen zu *N. equitans* verknüpft sind und deswegen zur äußeren Zellmembran eskortiert werden. Allerdings sind auch für Membranproteine der anderen *Ignicoccus* Spezies Signalsequenzen zu finden und *I. islandicus* bzw. *I. pacificus* dienen nicht als Wirt für *N. equitans*. Eine denkbare Erklärung wäre auch, dass die verfügbaren Programme zur Vorhersage von Signalsequenzen bei *I. hospitalis* Proteinen versagen, da der Organismus möglicherweise ein ungewöhnliches Muster für seine Signalpeptide benutzt. Signalsequenzen für SEC- bzw. Tat-Systeme sind generell ähnlich aufgebaut, mit dem Unterschied, dass für das Tat-System zwei nebeneinander liegenden Argininreste (twin-arginine motif) enthalten sein

müssen. Im Genom von *I. hospitalis* wurden Komponenten des Sec- und des Tat-Systems identifiziert (Podar *et al.*, 2008). Es besteht jedoch auch die Möglichkeit, dass *I. hospitalis* ein weiteres, bisher unbekanntes Sekretionssystem besitzt. Auch für Enzyme des CO₂-Fixierungsweges, welcher vollständig im IMC stattfindet, konnten mit einer Ausnahme keine Signalpeptide identifiziert werden (Flechsler, 2015). Da die Proteinbiosynthese im Cytoplasma stattfindet, müssen diese Proteine aber auf irgendeine Art und Weise durch die innere Membran transloziert werden, um an ihren Wirkungsort zu gelangen. Nach einer Codonoptimierung konnten aber Enzyme des CO₂-Fixierungsweges, ohne weitere Modifikationen in *E. coli* exprimiert werden (Flechsler, 2015). Die vergleichende Expression des Chloridkanals Iho1222 als Konstrukt mit vollständiger bzw. verkürzter Signalsequenz verlief in beiden Fällen negativ.

Weshalb die heterologe Expression der Membranproteine von *I. hospitalis* in *E. coli* letzten Endes nicht erfolgreich verlief, ist wohl nicht eindeutig zu klären. Nachdem trotz Codonoptimierung, zahlreicher Optimierungsversuche und der Verwendung spezieller Expressionsstämme und Vektoren keine Expression der Zielproteine nachweisbar war, ist der bakterielle Wirt *E. coli* für die Expression vermutlich ungeeignet. Da *I. hospitalis* ein hyperthermophiles Archaeum ist, unterscheidet sich der Organismus in dieser Hinsicht schon bereits in der Lipidzusammensetzung seiner Membranen deutlich von bakteriellen Organismen. Wie schon mehrfach gezeigt werden konnte, sind Lipide nicht nur für die Aktivität von Membranproteinen, sondern auch für deren korrekte Faltung, Stabilität und die Orientierung von Transmembranhelices verantwortlich (zusammengefasst in Opekarová und Tanner, 2003). Aus diesem Grund kann auch die Lipidzusammensetzung der Membran des jeweiligen Expressionswirtes den Erfolg der rekombinanten Proteinherstellung beeinflussen und sollte berücksichtigt werden. Proteine hyperthermophiler Organismen haben außerdem einzigartige strukturelle Eigenschaften entwickelt, um bei hohen Temperaturen ihre Stabilität und Aktivität zu behalten. Eine Expression in mesophilen Wirten kann also unter Umständen zu Veränderungen des nativen Zustands hyperthermophiler Proteine führen. Allerdings sind dafür nur wenige Beispiele in der Literatur zu finden (z.B. α -1,4-Glucan-Phosphorylase von *S. solfataricus*; Takemasa *et al.*, 2001), da von erfolglosen oder fehlgeschlagenen Experimenten normalerweise nicht berichtet wird. Einige Proteine benötigen für ihre Faltung und zur Erhaltung ihrer Thermostabilität extrinsische Faktoren (Salze, Polyamine, Chaperone) oder posttranslationale Modifikationen (Glykosylierung). Die Glykosylierung von Proteinen erfolgt durch das Anhängen von Zuckerresten (Oligosaccharide) entweder an einen Asparagin (N-glykosidisch) oder an einem Serin oder Threonin (O-glykosidisch) des Proteins. Lange Zeit ging man davon aus, dass solche Modifikationen nur in Eukaryoten vorkommen. Doch mittlerweile wurde gezeigt, dass verschiedene Glykosylierungswege auch in Bakterien und Archaeen zu finden sind

(Abu-Qarn *et al.*, 2008). Bakterielle Proteine werden hauptsächlich O-glykosiliert wohingegen archaeele Proteine vor allem N-glykosiliert werden.

Die meisten in der Literatur beschriebenen hyperthermophilen Proteine konnten jedoch in mesophilen Wirten exprimiert werden, ohne dabei ihre Stabilität oder katalytischen und strukturellen Eigenschaften, verglichen mit den nativ gereinigten Proteinen aus den ursprünglichen Organismen, einzubüßen (Vieille und Zeikus, 2001). Das spricht dafür, dass die meisten Proteine von Hyperthermophilen an sich sehr thermostabil sind und sich auch bei Temperaturen weit unterhalb ihrer physiologischen Optima korrekt falten können und ihre Aktivität behalten. Da sich *I. hospitalis* bereits in der Vergangenheit in vielerlei Hinsicht als sehr speziell herausgestellt hat, könnte das Problem auch bei den *I. hospitalis* Proteinen selbst liegen. Durch die außergewöhnliche Kompartimentierung und den Ort der Energiekonservierung hebt sich *I. hospitalis* von anderen Prokaryoten ab. Aufgrund dieser Überlegungen wurden nicht nur archaeele Expressionssysteme (*P. furiosus*, *T. kodakarensis*), sondern auch eukaryotische Expressionssysteme (*P. pastoris* und Sf9) verwendet.

Im Gegensatz zu den Membranproteinen von *I. hospitalis* war die Expression von „Nano-Proteinen“ problemlos in *E. coli* durchführbar. Nicht nur Neq014 konnte heterolog in *E. coli* überexprimiert werden, sondern auch Neq531, ein mechanosensitiver Kanal von *N. equitans* (Wiegmann, 2013). Aktuell wird außerdem der zweite mechanosensitive Kanal, Neq198, in *E. coli* exprimiert (laufende Dissertation Pia Wiegmann). Auch für *N. equitans* wurde ein Vergleich hinsichtlich der Codon Usage von *E. coli* angestellt. Es ergab sich ein durchschnittlicher Unterschied von 31,75 %. Neq014 wurde sowohl mit als auch ohne Codonoptimierung exprimiert. Für das nicht-codonoptimierte Konstrukt war nur eine Reihe von Abbaubanden detektierbar. Eine Hitzefällung war mit dem aufgereinigten nicht-codonoptimierten Protein nicht möglich. Inkorrekte Faltung, fehlende ionische Interaktionen oder auch die Abwesenheit von Lipiden und bestimmten Hilfsproteinen wie Chaperonen könnten die Stabilität des Proteins gegenüber hohen Temperaturen beeinflusst haben. Dies ist allerdings nicht unbedingt typisch für „Nano-Proteine“. Für den mechanosensitiven Kanal Neq531 konnte nach Solubilisierung mit DDM eine Temperaturfällung durchgeführt werden. Der Kanal blieb im Gegensatz zu Neq014 über den gesamten getesteten Temperaturbereich stabil (Wiegmann, 2013), obwohl er ebenfalls in *E. coli* exprimiert wurde. Für das codonoptimierte Konstrukt von Neq014 zeigte sich eine einzelne detektierbare Proteinbande und die Ausbeute konnte nach einer Optimierung der Reinigung auf 2 mg/ml (in circa 500 µl) gesteigert werden. Erste Kristallisationsversuche ergaben Nanokristalle von Neq014.

Auch Beispiele aus der Literatur zeigen, dass die Expression, Reinigung und Strukturanalyse von archaeele Membranproteinen in *E. coli* gut funktionieren kann (Ma *et al.*, 2013). Bei dieser Studie

wurden 15 archaeele Transportproteine aus zwei Protein Superfamilien, nämlich der MFS und SHIRT (5-Helix Inverted Repeat Transporter) Superfamilie, für die heterologe Expression in *E. coli* ausgewählt. Die Transporter stammten von insgesamt 11 phylogenetisch diversen Archaeen, welche unter extremen Bedingungen (hohe Temperaturen, hohe Salzkonzentrationen und/oder sauren pH-Werten) leben. Jeder Transporter wurde in drei verschiedene Expressionsvektoren (pWarf(-), pET52b (+), pTTQ18) kloniert. Die Expressionen wurden sowohl unter der Kontrolle eines T7- als auch eines Tac-Promotors durchgeführt. Die Konstrukte waren mit einem C-terminalen Polyhistidin-Tag (6–10x His) und zum Teil mit einem GFP- oder StreptII-Tag versehen. Für die Expression selbst wurden zwei unterschiedliche *E. coli* Stämme (BL21 Star, C43(DE3)) verwendet. Das Wachstum erfolgte bei 37 °C und die Ernte 3 h nach der Induktion. Für die unterschiedlichen Vektor-Stamm-Kombinationen ergaben sich zwar von Protein zu Protein sehr unterschiedliche Expressionserfolge, jedoch konnten insgesamt 13 der 15 Transporter erfolgreich exprimiert werden. Sechs davon konnten darüber hinaus in einem nicht-aggregierten Zustand gereinigt werden, wiederum zwei davon sogar in ausreichender Menge für strukturelle Analysen. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen also, dass es durchaus möglich ist archaeele Transportproteine im *small-scale* Volumen mit minimalem Aufwand in *E. coli* zu exprimieren. Die verwendeten Methoden sollen ein schnelles Screening im Hinblick auf eine erfolgreiche Expression von archaeeen Membranproteine ermöglichen.

4.1.2.2 Heterologe Expression in anderen Archaeen

Da sich Archaeen in vielerlei Hinsicht von Bakterien unterscheiden, liegt es nahe, auch archaeele Systeme für die Expression von archaeeen Proteinen zu verwenden. Allerdings gibt es (noch) nicht viele verfügbare genetische Systeme. Da Archaeen vor allem als extremophile Organismen bekannt sind, lassen sich die meisten routinemäßig eingesetzten genetischen Methoden nicht einfach übertragen (Allers und Mevarech, 2005). Bis jetzt konnten nur für vier Gruppen innerhalb der Archaea genetische Systeme entwickelt werden: für methanogene (*Methanococcales*, *Methanosarcinales*) und halophile (*Haloferax volcanii*, *Halobacterium salinarum*) Organismen sowie für Vertreter der *Thermococcales* (*T. kodakarensis*, *P. abyssi* und *P. furiosus*) und der *Sulfolobales* (*Sulfolobus solfataricus*, *S. islandicus* und *S. acidocaldarius*) (Leigh *et al.*, 2011). Zum Teil wurden diese Systeme auch schon für heterologe Genexpressionen eingesetzt (z.B.: Basen *et al.*, 2012; Lessner *et al.*, 2010), hauptsächlich dienen sie aber der homologen Expression in Verbindung mit Gen Knockouts, um die Physiologie, den Metabolismus und die regulatorischen Mechanismen des jeweiligen Organismus selbst besser verstehen zu lernen (Rother und Metcalf, 2005).

Für die Expression von Membranproteinen von *I. hospitalis* wurden *P. furiosus* und *T. kodakarensis* ausgewählt. Die Experimente mit *P. furiosus* wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Dr. Winfried Hausner (Universität Regensburg) durchgeführt, da das System dort mitentwickelt wurde und

routinemäßig verwendet wird, allerdings noch nicht für heterologe Proteinexpressionen. Für den putativen Chloridkanal Iho1222 ließ sich auch in *P. furiosus* keine positive Expression mit dem Vektor pYS3 erreichen. Ursache für das Scheitern dieses Ansatzes könnte zum einen sein, dass das hier verwendete System noch nicht für die heterologe Proteinexpression optimiert wurde. Forschern aus Georgia (USA) gelang es bereits, die NADH-abhängige Lactatdehydrogenase (LDH) des anaeroben Bakteriums *Caldicellulosiruptor bescii* heterolog in *P. furiosus* zu exprimieren (Basen *et al.*, 2012). Allerdings wurde in diesem Fall ein anderes Vektorsystem in Verbindung mit einem speziellen *P. furiosus* Mutantenstamm verwendet. Zum anderen könnte sich auch die Codon Usage von *P. furiosus* negativ auf den Expressionserfolg ausgewirkt haben. Eine Codonoptimierung wurde vor der Klonierung von Iho1222 nicht durchgeführt. Ein Vergleich der Codon Usage von *P. furiosus* und der Sequenz des Gens *iho1222* von *I. hospitalis* ergab einen durchschnittlichen Unterschied von rund 45 %. Eine Codonoptimierung hätte also durchaus eine Expression in *P. furiosus* begünstigen können.

In *T. kodakarensis* sollte der MFS Transporter Iho0298 nach Codonoptimierung exprimiert werden. Es konnten zwar rekombinante Plasmide hergestellt werden, doch die Transformation von *T. kodakarensis* verlief negativ. Da die Zellen nach der Crossover-Insertion eine Retardation im Wachstum zeigten, könnte es sein, dass das aktive Protein Iho0298 leicht toxisch wirkt (Aussage Prof. Dr. Haruyuki Atomi). Dass eine heterologe Expression in *T. kodakarensis* grundsätzlich möglich ist, zeigt ein Beispiel von *Sulfolobus solfataricus*: die α -1,4-Glucan-Phosphorylase des Organismus wurde in aktiver Form in *T. kodakarensis* exprimiert (Takemasa *et al.*, 2001).

Auch wenn in dieser Arbeit für zwei Membranproteine von *I. hospitalis* keine Expression in den beiden Archaeen *P. furiosus* und *T. kodakarensis* möglich war, macht es prinzipiell durchaus Sinn die Proteine von *I. hospitalis* in anderen hyperthermophilen Organismen zu exprimieren. Die Klonierung und Expression in mesophilen Wirten wie *E. coli* ist für Proteine (hyper)thermophiler Archaeen und Bakterien nicht immer möglich. Die bereits erwähnte α -1,4-Glucan-Phosphorylase von *S. solfataricus* konnte beispielsweise nicht in mesophilen Wirten exprimiert werden. Dies zeigt, dass sich archaeelle Systeme durchaus als Alternativen für die Synthese von rekombinanten Proteinen anderer (hyper)thermophiler Organismen eignen.

4.1.2.3 Heterologe Expression in eukaryotischen Systemen

Im Folgenden wurden zwei eukaryotische Wirte für weitere Expressionsversuche ausgewählt: die Sf9 Insektenzelllinie aus Ovar-Zellen von *Spodoptera frugiperda*, einer Mottenart der Familie der Eulenfalter und die einzellige methylotrophe Hefe *P. pastoris*.

Generell haben beide Systeme ihre Vor- und Nachteile für die Expression. Hefesysteme haben den Vorteil, dass sie im Vergleich zu Zellkulturlinien kostengünstig und einfach zu kultivieren sind.

Allerdings ist die Selektion und Auswahl von Transformanten ein langwieriger Prozess. Auch die Herstellung rekombinanter Baculoviren benötigt Zeit, der Arbeitsaufwand dafür ist aber im Vergleich geringer. *P. pastoris* Zellen können in Minimalmedium zu hohen Dichten kultiviert werden. Hinzu kommt, dass im Medium nur eine Kohlenstoff- sowie Stickstoffquelle enthalten ist, wodurch radioaktive Markierungsversuche (z.B. für NMR Analysen) möglich sind. Insektenzellen werden oft für die Expression von Membranproteinen aus Säugetieren favorisiert, da die Ähnlichkeit zwischen diesen beiden eukaryotischen Systemen relativ hoch ist. Da standardmäßig die Sf9 als auch die *P. pastoris* Zellen ohne Antibiotika kultiviert werden, ist eine sterile Arbeitsweise unerlässlich. Separate Inkubatoren, das Arbeiten unter der Sterilbank und ein für die Zellkultur abgetrennter Raum sind darüber hinaus notwendig.

Für eine erfolgreiche Expression von archaeellen Proteinen in Insektenzellen gibt es bisher noch keine Veröffentlichungen. Für Hefezellen zeigt sich ein anderes Bild wie Labarre *et al.* (2007) berichteten. Es konnten fünf Membranproteine von *Pyrococcus abyssi*, darunter ein Chloridkanal und ein ABC-Transporter, heterolog in *P. pastoris* exprimiert und z.T. auch schon gereinigt werden. Außerdem konnte eine Ornithin-Carbamoyltransferase sowie eine beta-Glucosidase von *P. furiosus* in *S. cerevisiae* in stabiler Form exprimiert werden (Villeret *et al.*, 1998; Smith und Robinson, 2002). Die Expression des MFS Proteins Iho0391 fiel in den beiden hier verwendeten eukaryotischen Systemen unterschiedlich aus.

Für die Expression in Sf9 Insektenzellen wurde ein für *P. pastoris* codonoptimiertes Konstrukt verwendet. Sowohl das System an sich, als auch die Herstellung der rekombinanten Viren hatten funktioniert. Trotzdem zeigte sich nach der Expression im SDS-Gel ein Muster aus diversen Banden, die vermutlich durch Abbau des Zielproteins entstanden sind.

Die Expression in *P. pastoris* verlief im Gegensatz dazu äußerst vielversprechend. Da es hinsichtlich der Codon Usage zwischen *P. pastoris* und der Sequenz für das Gen *ih0391* einen Unterschied von 44,4 % gab, wurde eine Codonoptimierung durchgeführt. Nach einer Testexpression der positiven Transformanten konnte ein Protein mit einem apparenten Molekulargewicht von circa 37 kDa nachgewiesen werden. Es traten zu keinem Zeitpunkt, von Expression bis hin zur Membranpräparation, Abbaubanden auf.

Warum letztendlich die Expression in den beiden eukaryotischen Systemen unterschiedlich ausfiel, kann nicht sicher geklärt werden. Eine Möglichkeit wäre, dass Iho0391 speziell für die Expression in Insektenzellen hätte optimiert werden müssen. In dieser Arbeit wurde das für *P. pastoris* optimierte Konstrukt in den Sf9 Zellen verwendet. Laut Codon Usage Analyser ergibt sich für *P. pastoris* und Sf9 Insektenzellen ein durchschnittlicher Unterschied von rund 26 %. Dies könnte ein Grund sein, dass

gewisse Aminosäuren bei der Translation in Insektenzellen nicht erkannt wurden und so unvollständiges Protein entstand bzw. das Protein nicht richtig gefaltet werden konnte und daher proteolytisch verdaut wurde. Dies würde zumindest die vielen beobachteten Abbaubanden nach der Expression in Sf9 erklären. Vielleicht gab es zudem Probleme bei der Herstellung der rekombinanten Viren. Wie auch schon für *E. coli* angesprochen, kann z.B. auch die Lipidzusammensetzung die Expression von Membranproteinen beeinflussen. Diese unterscheidet sich durchaus für Insektenzellen und Hefezellen. Insektenzellen besitzen z.B. kein Phosphatidylserin und keine Glykolipide, haben dafür aber einen hohen Anteil an Phosphatidylinositol. Bei Hefezellen sind alle drei dieser Lipide zu finden (Opekarová und Tanner, 2003). Da auch in Archaeen Glykolipide und Analoge des Phosphatidylserins vorkommen, wäre es denkbar, dass dadurch die Expressionsergebnisse beeinflusst wurden.

4.2 Analyse des MFS Transporters Tko1655 von *T. kodakarensis*

Da die Expression der MFS Transporter von *I. hospitalis* in *E. coli* bzw. *T. kodakarensis* nur wenig Erfolg hatte, wurde parallel dazu ein MFS Transporter eines anderen archaeellen Organismus heterolog exprimiert. Die Wahl fiel dabei auf *T. kodakarensis*. Zum einen konnten bereits andere Membranproteine von *T. kodakarensis* erfolgreich in *E. coli* exprimiert und sogar kristallisiert werden (Jensen *et al.*, 2013). Zum anderen ist dieser Organismus genau wie *I. hospitalis* ein strikt anaerobes, hyperthermophiles Archaeum. Nach Sequenzalignments stellte sich heraus, dass der MFS Transporter Iho0800 und das Protein Tko1655, ebenfalls als MFS Protein annotiert, die größte Ähnlichkeit zueinander aufwiesen (35 %). Die Klonierung und Expression in *E. coli* führte nach einer Reinigung zu einem Protein mit einem apparenten Molekulargewicht von circa 60 kDa. Unter Verwendung der „Mix & Match“ Methode (Madej *et al.*, 2013 und Madej und Kaback, 2013) wurde ein Homologiemodell des MFS Transporters erstellt (Plobner, 2011). Dementsprechend wurde Tko1655 in vier Triplets aufgeteilt und diese unabhängig voneinander untersucht. Für drei Triplets konnten homologe Strukturen identifiziert werden, wobei nach Betrachtung der Gesamtstruktur des Transporters Tko1655 der Glycerin-3-Phosphat Transporter GlpT von *E. coli* (Lemieux *et al.*, 2005) zumindest strukturell die größte Ähnlichkeit zu Tko1655 aufweist (Plobner, 2011). Um dies zu verifizieren, müssten aber noch weitere und detailliertere Analysen durchgeführt werden. GlpT ist ein Antiporter und transportiert Glycerin-3-Phosphat (G3P) im Austausch mit inorganischem Phosphat durch die Membran. G3P entsteht im Zuge der Synthese von Neutralfetten und Phospholipiden (Triacylglycerin-Biosynthese oder Phosphoglycerid-Biosynthese) aus Glycerin und kann durch das Enzym Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase in Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) umgewandelt werden. DHAP kann wiederum in die Glykolyse oder die Gluconeogenese eingeschleust werden. Da Glycerin Bestandteil archaeeller Membranen ist, könnte es durchaus sein, dass G3P auch in *I. hospitalis*

gebildet wird. Außerdem wurden im Genom von *I. hospitalis* fast alle Gene, die zur Gluconeogenese (über den rückwärts gerichteten Embden-Meyerhoff-Weg) benötigt werden, gefunden (Jahn *et al.*, 2007). Da die gesamte CO₂ Fixierung im IMC von *I. hospitalis* stattfindet (Flechsler, 2015), könnte es sein, dass dort auch noch weitere enzymatische Reaktionen ablaufen. Würde also beispielsweise G3P im Cytoplasma synthetisiert werden und die Gluconeogenese zum Teil im IMC erfolgen, müsste G3P durch die Cytoplasmamembran transportiert werden. Wenn man davon ausgeht, dass die Struktur eines Proteins dessen Funktion bestimmt, dann könnte dieser Transport möglicherweise durch Iho0800, ein Homolog zu Tko1655 und somit eventuell zu GlpT, vermittelt werden. Wie bereits erwähnt, wird auch Iho0800 in Anwesenheit von *N. equitans* hochreguliert. Dies konnte bei vergleichenden Analysen des Proteoms und des Transkriptoms der *I. hospitalis* Reinkultur (KIN4/I) und der Cokultur (KIN4/M) festgestellt werden (Giannone *et al.*, 2015). In Anwesenheit von *N. equitans* könnte demnach der Energiebedarf in *I. hospitalis* und folglich z.B. auch Stoffwechselprozesse wie die Gluconeogenese gesteigert werden.

4.3 Putative ATP-Transportfunktion des MFS Transporters Iho0391

Durch die Erstellung eines Homologiemodells für den putativen MFS Transporter Iho0391 von *I. hospitalis*, konnte ein Antiporter-Motiv in der Sequenz identifiziert werden. Da es die Hypothese gibt, dass Mitglieder der Major Facilitator Superfamilie entfernt mit der Familie der ATP/ADP Antiporter verwandt sind, rief dies Assoziationen zu einer möglichen ATP/ADP Transportfunktion von Iho0391 hervor. Diese Fragestellung wurde deshalb sowohl experimentell (SEC Analyse mit Mg-ATP und Tryptophan-Fluoreszenzmessung, siehe 3.4.3.3) als auch bioinformatisch eruiert. Ein eindeutiger Effekt von Mg-ATP auf das Protein während der Gelfiltration ließ sich nicht erkennen. In Übereinstimmung mit dem erstellten Homologiemodell konnte ein Tryptophan (Trp120) in der Bindetasche von Iho0391 identifiziert werden. Die aromatische Aminosäure Tryptophan weist eine Eigenfluoreszenz (intrinsische Fluoreszenz) auf und kann daher als Fluorophor für Untersuchungen an Proteinen genutzt werden. Die Tryptophanfluoreszenz hängt in hohem Maße von den Bedingungen in der unmittelbaren Umgebung der Aminosäure ab und kann zum Beispiel dazu verwendet werden Konformationsänderungen eines Proteins oder seine Interaktionen mit Liganden festzustellen. Das bedeutet, dass Veränderungen in der Intensität der Fluoreszenz (Zunahme oder Abnahme) auf strukturelle Veränderungen in der Umgebung des Fluorophors hinweisen (Ghisaidoobe und Chung, 2014). Steigende Mg-ATP-Konzentrationen führten zu einer sichtbaren Abnahme der Tryptophanfluoreszenz von Iho0391, welche nicht aus einem Quenching-Effekt durch Wechselwirkung mit dem verwendeten Puffer resultierte. Durch Zugabe von Mg-ATP wurde tatsächlich eine Veränderung in der unmittelbaren Umgebung eines Tryptophans von Iho0391 hervorgerufen. Eine

Interaktion des Liganden (Mg-ATP) mit Trp120, welches sich unmittelbar in der vorhergesagten Bindetasche des Proteins befindet, könnte eben diese Änderung hervorgerufen haben. Dieses Ergebnis unterstreicht die Vermutung, dass das MFS Protein Iho0391 als ATP-Transporter in Frage kommen könnte.

Eine ATP-induzierte Änderung der Tryptophan Fluoreszenz wurde bereits für zahlreiche andere Proteine beobachtet. Die intrinsische Fluoreszenz der Ca^{2+} -ATPase im sarkoplasmatischen Retikulum von Muskelzellen nimmt nach Zugabe von ATP um 1,1 % ab, da nach Bindung von ATP die Bildung eines ADP-sensitiven Intermediats eingeleitet wird (Nakamura et al., 1994). In viele ABC-Transporter, wie z.B. dem Maltosetransporter MalK von *Salmonella typhimurium*, wird nach Bindung von ATP eine strukturelle Umordnung in der ATP-Bindedomäne induziert (Schneider et al., 1994). Auch in diesem Fall wurde ein Rückgang der Tryptophanfluoreszenz beobachtet. In pflanzlichen Cytochromen (Burney et al., 2009) und dem Chemotaxisprotein CheA von *E. coli* (Stewart, 2005) werden ebenfalls nach Bindung von ATP Konformationsänderungen hervorgerufen, die mit einer Abnahme der Tryptophanfluoreszenz einhergehen.

Auch die zusätzlich durchgeführten Docking-Experimente unterstützten die Hypothese eines ATP-Transportes durch den putativen MFS Transporter Iho0391. Durch diese Methode konnten mehrere mögliche Konformationen für eine Interaktion von ATP und dem Protein ermittelt werden. Docking Experimente können prinzipiell gute Hinweise auf mögliche Substrate liefern. Allerdings hat sich eine allgemeingültige Richtlinie etabliert: nur Homologiemodelle mit mehr als 50 % Sequenzidentität zum Template sind für Docking Experimente hinreichend (Borgogna et al., 2011). Deswegen sind die Ergebnisse mit Vorsicht zu betrachten. Das Homologiemodell für Iho0391 entstand gemäß Sequenzalignments aus den beiden MFS Transportern YajR und FucP. Für YajR wird vermutet, dass dies ein Multidrug Efflux Protein sein könnte, da es 21 % Sequenzidentität zu einem anderen Multidrug Resistenz Antiporter (EmrD) aufweist (Nishino und Yamaguchi, 2001). Grundsätzlich wäre daher eine Vielzahl möglicher anderer Substrate für Iho0391 denkbar. Der EmrD Transporter dient z.B. dem Abtransport von Entkopplern der oxidativen Phosphorylierung, namentlich Carbonylcyanid-m-chlorophenylhydrazon (CCCP) und Tetrachlorsalicylanilid (TCS), welche ansonsten durch Abbau des bestehenden H^+ Gradienten das Wachstum von Bakterien hemmen würden (Naroditskaya et al., 1993). Aber auch Detergenzien wie Benzalkonium und SDS können von EmrD transportiert werden (Nishino und Yamaguchi, 2001). Da die Substrate der Multidrug Transporter zahlreich sind und viele verschiedene, vor allem toxische Substanzen mit einschließen, ist eine Auswahl zu testender Substrate für Iho0391 sehr schwierig. Trotzdem wurden bereits erste Docking-Experimente für Iho0391 und einige andere Moleküle, die mit verschiedenen bakteriellen Multidrug Antiportern in Verbindung gebracht wurden, durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass für vier andere Substrate niedrigere

Affinitätswert als für ATP (-6,2) ermittelt werden konnten (mündliche Aussage Dr. Silvia de Sanctis). Der Fluoreszenzfarbstoff DAPI erzielte einen Wert von -9,5. Dequalinium (-8,4), Chlorhexidin (-8,1), Pentamidin (-6,9) und Chloramphenicol (-6,7), allesamt antimikrobielle Wirkstoffe bzw. Antiseptika, lagen etwas dahinter.

Verfolgt man die Hypothese eines möglichen ATP Transportes durch das putative MFS Protein Iho0391 weiter, ist die Lokalisation des Proteins eine weitere wichtige Methode zur Aufklärung der mutmaßlichen Funktion. Die dringende Notwendigkeit eines ATP Transporters für *I. hospitalis* selbst wurde bereits geschildert. Aber auch im Hinblick auf einen möglichen Energietransfer zu *N. equitans* wäre ein solcher Transporter von großem Interesse. Immunmarkierungen der Ultradünnschnitte von *I. hospitalis* Zellen zeigten, dass der gegen Iho0391 hergestellte Antikörper (anti-Iho0391) vor allem in der OCM markierte. Weitere Signale konnten im Cytoplasma bzw. dessen röhrenförmigen Ausläufern detektiert werden. Da die Proteinbiosynthese im Cytoplasma stattfindet, ist dies aber nicht verwunderlich. Auch in einem Western Blot, der zur Überprüfung der Spezifität des Antikörpers durchgeführt wurde, konnten Signale auf adäquater Höhe nachgewiesen werden. Die Anwesenheit eines ATP Transporters in der OCM von *I. hospitalis* könnte auf einen Energietransfer zu *N. equitans* hinweisen. Prinzipiell könnten auch Aminosäuren bzw. deren Vorstufen oder generell substituierte Aromaten als Substrate für Iho0391 in Frage kommen. Aber auch Nukleotide weisen eine aromatische Grundstruktur auf. Da speziell für Nukleotide bisher noch keine Aufnahmestudien in *I. hospitalis* durchgeführt wurden, könnte dies durch radioaktiv markierte Moleküle (^{15}N) oder den Einsatz spezieller ATP Isotope (α - bzw. γ - ^{32}P) nachgeholt werden.

Durch Radioaktivmarkierungen konnte bereits gezeigt werden, dass *N. equitans* zumindest Lipide und Aminosäuren von seinem Wirt *I. hospitalis* bezieht (Jahn *et al.*, 2004). Wie *N. equitans* jedoch seine Energie gewinnt ist bisher ungeklärt. Eine rudimentäre ATP-Synthase/ATPase ist zwar in seinem Genom annotiert (Waters *et al.*, 2003), allerdings war es bisher nicht möglich, das Enzym zu isolieren und hinsichtlich Struktur und Funktionalität zu charakterisieren. Deshalb kann keine Aussage zur selbstständigen Energiekonservierung in *N. equitans* getroffen werden. Zudem konnte im Genom von *N. equitans* keine primäre Ionenpumpe identifiziert werden (Waters *et al.*, 2003). Somit kann auch kein entsprechender Ionengradient aufgebaut werden, der ein Enzym wie die ATP-Synthase antreiben könnte. Im Gegensatz dazu gibt es mehrere Hinweise, dass *N. equitans* auch seine Energie von *I. hospitalis* bezieht. Besonders die Lage der ATP-Synthase/ATPase in der OCM von *I. hospitalis* und die damit verbundene hohe ATP-Konzentration im IMC würden einen Export zu *N. equitans* begünstigen, da der Transport nur durch zwei Membranen erfolgen müsste (Küper *et al.*, 2010). Bei vergleichenden Analysen des Proteoms und des Transkriptoms der *I. hospitalis* Reinkultur (KIN4/I) und der Cokultur (KIN4/M) wurde festgestellt, dass die Expression der H_2 -Schwefeloxidorreduktase und der ATP-

Synthase/ATPase von *I. hospitalis* in Anwesenheit von *N. equitans* um den Faktor zwei hochreguliert ist (Giannone *et al.*, 2015). Falls *N. equitans* also tatsächlich von *I. hospitalis* mit ATP versorgt wird, könnte dies also auch ein Grund für den erhöhten Energiebedarf in der Cokultur sein. In diesem Zusammenhang sollte erwähnt werden, dass auch Iho0391, neben den MFS Transportern Iho0555 und Iho0800, in der Cokultur hochreguliert wird (Giannone *et al.*, 2015). Dies alles stützt die These eines Energietransfers zwischen *I. hospitalis* und *N. equitans*.

Prinzipiell gibt es Hinweise, dass nur Komponenten bzw. Moleküle ≤ 27 kDa von *I. hospitalis* zu *N. equitans* transportiert werden können (Seistrup *et al.*, in Vorbereitung). Ob also z.B. ganze Proteine an *N. equitans* abgegeben werden, ist daher fraglich. Diese Vermutung wurde auf Grund verschiedener Immunlokalisationsstudien angestellt. Die Proteine Iho0475, Iho0561 sowie Iho0994 und Iho0996 konnten in den Cytoplasmen beider Organismen gefunden werden, obwohl die entsprechenden Gene nur im Genom von *I. hospitalis* annotiert sind (Heimerl, 2014; Flechsler, 2015). Daher wurde ein Transport dieser Proteine von *I. hospitalis* zu *N. equitans* prognostiziert. Iho0475 ist eine 4-Hydroxybutyryl-CoA Synthetase des CO₂-Fixierungsweges, Iho0561 ein WD40 Protein, Iho0094 (Vps4) und Iho0096 (CdvA) sind Komponenten der ESCRT-Maschinerie. Diese Proteine sind alle größer als 27 kDa. Ob tatsächlich ein Transport stattfindet, bleibt zu klären. Ein ungerichteter Transport zu *N. equitans* scheint zumindest durch die beobachtete Fusion der Cytoplasmen beider Organismen möglich zu sein (Heimerl, 2014). Unklar ist, ob die akquirierten Proteine von *N. equitans* funktionell genutzt werden oder ob sie nur als Kohlenstoff- bzw. Stickstoffquelle genutzt werden und dementsprechend abgebaut werden. Der Austausch von kleineren Bruchstücken der entsprechenden Proteine zwischen *I. hospitalis* zu *N. equitans* könnte wiederum durch Transporter vermittelt werden.

4.4 Ausblick

E. coli scheint für die Expression von Membranproteinen von *I. hospitalis* ungeeignet zu sein. Zwar ist das Repertoire der verfügbaren genetischen Tools für dieses Expressionssystem noch nicht vollends ausgeschöpft und es besteht zum Beispiel noch die Möglichkeit *E. coli* spezifische Signalpeptide, wie *pelB* oder *ompT*, an die Zielproteine zu fusionieren, um das korrekte Targeting der Membranproteine zu verbessern. Des Weiteren können gleichzeitig Hilfsproteinen wie Chaperone oder Foldasen coexprimiert werden, welche die korrekte Faltung der exprimierten Zielproteine unterstützen können. In *E. coli* gibt es dabei verschiedene Systeme, wie das GroES-GroEL oder das DnaK-DnaJ-GrpE System (Nishihara *et al.*, 1998). Für die Expression von Hydrolasen aus *I. hospitalis* wurde sogar eine synthetische Chaperonkassette, die aus den Chaperonen Hsp60I (Iho0096) und Hsp60II (Iho0897), den Prefoldinen Pfl (Iho0087) und PflI (Iho0813) sowie dem kleinen Hitzeschockprotein sHsp (Iho1363) aus

dem Genom von *I. hospitalis* besteht, hergestellt (König, 2014). Zwar konnte durch Verwendung der Chaperonkassette für nur eine Hydrolase die Expression in *E. coli* verbessert werden, allerdings wurde nicht überprüft, ob die Chaperonkassette wirklich zusätzlich zu den rekombinanten Proteinen exprimiert wird. Die kann aber zum Beispiel durch quantitative Real-Time PCRs kontrolliert werden. Dieses System könnte auch bei der Expression von Membranproteinen hilfreich sein, da somit vielleicht ein proteolytischer Abbau auf Grund inkorrekt gefalteter Proteine verhindert werden könnte. Mittlerweile gibt es auch ein Beispiel für die erfolgreiche heterologe Expression eines Membranproteins von *I. hospitalis* in *E. coli* (Bittner, 2015). Iho1293, ein als Ammonium Transporter annotiertes Proteine, konnte über den pET21a(+) Vektor nach Codonoptimierung im Stamm C43 exprimiert werden und lieferte ein Protein mit einem apparenten Molekulargewicht von circa 35 kDa. Dieses Protein wurde bereits mittels IMAC aufgereinigt, allerdings sind die resultierenden Signale im Western Blot nicht sehr stark ausgeprägt. Von daher ist es fraglich ob die Proteinmenge für weiterführende Experimente (z.B. Kristallisation) ausreicht. Zur Verifizierung der Expression von Iho1293 sollte außerdem die Reproduzierbarkeit der erhaltenen Ergebnisse überprüft werden. Auch eine MALDI-TOF Analyse der entsprechenden Proteinbande ist notwendig. Zudem zeigten sich nach der Expression in Proben der induzierten, sowie nicht-induzierten Kontrollansätze vollkommen identische Bandenmuster im Comassie gefärbten SDS-Gel. Ein Western Blot dieser Proben wurde nicht durchgeführt. Es fehlen momentan also noch einige Kontrollen, um eine eindeutige Aussage hinsichtlich des Expressionserfolg treffen zu können.

Für lösliche Proteine von *I. hospitalis* scheint *E. coli* zumindest nach Codonoptimierung durchaus geeignet zu sein. Für Enzyme des CO₂-Fixierungsweges (Flechsler, 2015), verschiedene Hydrolasen (König, 2014) sowie ein regulatorisches Protein aus der Familie der Stickstoff Regulator Proteine P-II (Bittner, 2015) konnte eine erfolgreiche Expression nachgewiesen werden.

Die Expression in archaeellen Systemen bzw. in Sf9 Insektenzellen ist mit Sicherheit noch nicht vollständig ausgereizt und müsste in vielfacher Hinsicht optimiert werden. Ob sich dies allerdings lohnen würde, ist fraglich. Denn anhand der hier erzielten Ergebnisse scheint sich die heterologe Expression in *P. pastoris* für Membranproteine von *I. hospitalis* am besten zu eignen. Als nächstes sollten jedoch noch weitere Proteine in der methylotrophen Hefe exprimiert werden. Geeignete Kandidaten dafür wurden in dieser Arbeit identifiziert.

Um die Hypothese eines ATP-Transportes durch das MFS Protein Iho0391 weiter zu verfolgen, sollten die Tryptophan-Fluoreszenzmessungen mit Mg-ATP nicht nur reproduziert, sondern zusätzlich auch mit anderen ATP Komplexen (Ca²⁺, Na⁺, K⁺) wiederholt werden. Zur Kontrolle könnten außerdem Substrate, die als mögliche Liganden ausgeschlossen werden können, getestet werden. Da *I. hospitalis*

ein hyperthermophiler Organismus ist, sollten die Messungen außerdem nicht nur bei 25 °C durchgeführt werden, sondern auch bei höheren Temperaturen. Auch Methoden wie die sogenannte „Microscale Thermophoresis“ (MST), bei der mit Hilfe eines Infrarot-Lasers ein definierter mikroskopischer Temperaturgradient erzeugt wird, um molekulare Interaktionen messen zu können, kommen für weitere Experimente in Frage. Diese Messungen beruhen auf der gerichteten Bewegung von Molekülen entlang des Temperaturgradienten (Thermophorese). Diese ist abhängig von der Größe, der Ladung und der Hydrathülle eines Moleküls (Protein, Nukleinsäure) und kann sich z.B. durch Bindung eines Liganden verändern (Zillner *et al.*, 2012). Auch die SPR-Technologie (*surface plasmon resonance*) könnte ein nützliches Werkzeug für Interaktionsmessungen darstellen. Dieses System besteht aus einem Sensor-Chip, auf dessen Oberfläche ein zu untersuchender Bindungspartner immobilisiert wird. Der andere Bindungspartner wird durch ein Mikrofluss-System über diese Oberfläche geleitet, die Wechselwirkung kann dabei ohne Markierung der Biomoleküle mit Hilfe der Oberflächen-Plasmonresonanz verfolgt werden (Nieba *et al.*, 1997). Auch eine mögliche Interaktion mit anderen Moleküle (z.B. Substrate bakterieller Multidrug Transporter) könnte mit Hilfe von MST oder SPR überprüft werden.

Um ihre native Struktur und Aktivität zurückzuerlangen, müssen viele Membranproteine aus einer Detergenzlösung in Lipidvesikel rekonstituiert werden. Eine Rekonstitution des gereinigten Proteins Iho0391 in Liposomen kann deswegen notwendig sein, um funktionelle Analysen durchzuführen. Dabei können nicht nur verschiedene Methoden getestet werden, es müssen auch geeignete Lipide für archaeele Membranproteine gefunden werden.

Da die Rekonstitution in Liposomen oftmals mit einem Aktivitätsverlust einhergeht und die Vesikel darüber hinaus oftmals relativ instabil sind, d.h. eine hohe Tendenz zur Aggregation bzw. Fusion aufweisen, können Proteine auch in sogenannte Nanodiscs überführt werden (Borch und Hamann, 2009). Nanodiscs sind 5–20 nm große Scheiben aus Phospholipid-Doppelschichten, deren hydrophobe Ränder durch ein amphiphiles Protein, das Membrane Scaffold Protein (MSP), stabilisiert werden. Diese selbstorganisierenden Modellmembranen betten die darin aufgenommen Proteine in eine nahezu native Umgebung ein und halten sie in einer Detergenz-freien Umgebung stabil in Lösung (Nath *et al.*, 2007). Der Einsatz von Nanodiscs bietet die Möglichkeit Membranproteine mittels Flüssigkeits-basierten Methoden (z.B. Flüssig-NMR-Spektroskopie) zu untersuchen. Außerdem sind beide Seiten des Bilayers für Bindestudien zugänglich.

Um die Kristallisation von Iho0391 voranzutreiben, könnten andere Mg-ATP Konzentrationen in den Kristallisationsansätzen bzw. andere ATP-Komplexe getestet werden. Vielleicht ist es auch notwendig, das Protein durch Mutationen, Deletionen oder Insertionen für die Kristallisation zu stabilisieren. Neben der Gasphasendiffusion gibt es noch weitere *in surfo* Kristallisationsmethoden, wie die

Microdialyse oder das Batch-Verfahren, die genutzt werden können. Auch *in meso* Methoden, wie Bizellen oder LCP (lipidic cubic phase), könnten zur Kristallisation eingesetzt werden. Bei der LCP-Technik werden Proteine in einer lipidhaltigen Umgebung kristallisiert, was gerade für die Kristallisation von Membranproteinen besonders förderlich sein kann (Cherezov, 2011). Auf diese Weise wurden zum Beispiel hochauflösende Strukturen von menschlichen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) erzielt (Cherezov *et al.*, 2007). Durch LCP werden die Proteine durch die membranähnliche Umgebung nicht nur stabilisiert, gleichzeitig wirkt die Methode als eine Art Filter, da Verunreinigungen und Proteinaggregate entfernt werden.

Darüber hinaus gibt es aber noch zahlreiche andere Möglichkeiten die Struktur eines Proteins aufzuklären. Geeignete Methoden sind beispielsweise die NMR-Spektroskopie, die Elektronenmikroskopie für die Erzeugung von 2D-Kristallen oder auch Single Particle Analysen.

Da die Expression von Transportern aus *N. equitans* in *E. coli* gut funktioniert, sollten noch andere Membranproteine von *N. equitans* exprimiert und untersucht werden. Dies ist vor allem im Hinblick auf die Aufklärung der Interaktion zwischen *N. equitans* und *I. hospitalis* von Bedeutung. An erster Stelle steht aber weiterhin die Strukturaufklärung von Neq014. Um zunächst den Oligomerisierungszustand feststellen zu können, bieten sich Methoden wie die Mehrwinkel-Laserlichtstreuung (Multi-Angle Laser Light Scattering, MALLS) in Kombination mit einer Größenausschluss-Chromatographie (SEC) an. Durch die Verknüpfung beider Verfahren (SEC-MALLS), kann der Oligomerisierungszustand von Proteinen in Detergenz-Komplexen zuverlässig ermittelt werden (Slotboom *et al.*, 2008). Aber auch die LILBID (*laser induced liquid bead ion desorption*) Massenspektrometrie kann für eine Massenbestimmung herangezogen werden.

Da auch für Neq014 bisher noch keine Kristalle erzeugt werden konnten, ist zu überlegen, z.B. Mutationen vorzunehmen oder das Protein in Verbindung mit möglichen Liganden zu kristallisieren. Dafür ist die Erstellung eines Homologiemodells zwingend erforderlich. Nur so kann die Anordnung wichtiger Aminosäurereste, die z.B. mutiert werden sollen, vorhergesagt werden, um die Eigenschaften des Zielproteins zu verändern. Als Vorlage könnte wiederum der Tellurit-Resistenz Transporter (TehA) aus *Haemophilus influenzae* dienen. Auch der SERp Server (Goldschmidt *et al.*, 2007) kann für die Identifizierung von geeigneten Mutationsstellen, welche die Kristallisation positiv beeinflussen könnten, herangezogen werden. Darüber hinaus können auch *in meso* Kristallisationsmethoden, NMR-Spektroskopie oder Elektronenmikroskopie für die Strukturanalyse genutzt werden.

Für funktionelle Studien könnte außerdem eine Rekonstitution in Liposomen oder der Einbau in Nanodiscs durchgeführt werden.

Auch die Lokalisation von Neq014 in der Cokultur wäre äußerst interessant. Eventuell könnte das Protein sogar an den Cytoplasmapolen detektiert werden. Gegen das rekombinant hergestellte und gereinigte Protein wurden auch bereits Antikörper in Kaninchen hergestellt (Firma Davids, Regensburg). In Western Blots konnten jedoch bei verschiedenen Verdünnungen keinerlei Signale detektiert werden. In Immunlokalisationen wurde der Antikörper bisher noch nicht getestet. Gegebenenfalls muss also die Immunisierung wiederholt werden, um Aussagen zur Lage von Neq014 treffen zu können.

Da sich Membranproteine aus *N. equitans* gut für die Expression in *E. coli* eignen, könnten sich eventuell auch Membranproteine der inneren Membran von *I. hospitalis* gut in dem bakteriellen Wirt exprimieren lassen. Die Cytoplasmamembran von *N. equitans* entspricht in ihrer Lipidzusammensetzung der IM von *I. hospitalis* (Jahn *et al.*, 2004; Jahn *et al.*, 2008). Eine Vorhersage der Lokalisation der Membranproteine von *I. hospitalis* ist zwar nicht möglich, doch sehr gute Kandidaten wären Proteine des Tat-Systems. Zumindest im Genom wurden Komponenten dieses Sekretionssystems identifiziert (Podar *et al.*, 2008). Da die im Cytoplasma synthetisierten Proteine wie bereits erwähnt in das ICM oder die OCM gelangen müssen, ist es nicht unwahrscheinlich, dass das Tat-System in der IM lokalisiert ist. Würde sich dies bewahrheiten, hätte man somit gleichzeitig einen „Marker“ für die innere Membran. Dies wäre für zukünftige Lokalisationsexperimente eine gute Kontrolle. Außerdem könnte man somit schlussfolgern, dass auch die innere Membran energetisiert ist, da man im Allgemeinen davon ausgeht, dass der Tat-Transport ausschließlich vom Protonengradienten an energetisierten Membranen angetrieben wird. Für die meisten Systeme *in vitro* scheint der pH-Gradient (ΔpH) die treibende Kraft der pmf (*proton motive force*) zu sein (Mori und Cline, 2002). Allerdings konnte bereits gezeigt werden, dass z.B. in *Chlamydomonas reinhardtii* das thylakoidale Tat-System auch ohne einen signifikanten pH-Gradienten funktioniert (Finazzi *et al.*, 2003) und scheinbar allein durch das elektrische Membranpotential $\Delta\Psi$ angetrieben wird.

Die Untersuchung von Membranproteinen bzw. Transportern aus *I. hospitalis* und *N. equitans* ist im Hinblick auf die Aufklärung der Kommunikation und des Zusammenspiels der beiden Organismen unverzichtbar. Auch vergleichende Analysen des Proteoms von *I. hospitalis* Reinkulturen mit dem Proteom der Cokultur haben gezeigt, dass die Anzahl der Membranproteine in der Cokultur um 50 % ansteigt (Giannone *et al.*, 2015). *N. equitans* hängt wohl energetisch und metabolisch von *I. hospitalis* ab, ein Transport zwischen beiden Organismen muss daher zwingend stattfinden.

Die Tatsache, dass *I. hospitalis* trotz seines reduzierten Genoms insgesamt acht MFS Transporter aufweist und darüber hinaus die Expression drei dieser Proteine in Anwesenheit von *N. equitans*

gesteigert wird, verdeutlicht die große Bedeutung dieser sekundären Transporter für beide Organismen.

Bis jetzt gibt es nur acht Fälle, in denen eine erfolgreiche Expression, Reinigung und Kristallisation archaeeiler sekundärer Transporter möglich war (Tab. 5).

Tabelle 5: Gelöste Kristallstrukturen sekundärer Transportproteine von Archaeen.

Organismus	PDB entry	Transporter	Auflösung	Expressionsstamm	Detergenz	Referenz
<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	2B2H	Amt-1 NH ⁴⁺ -Transporter	1,54 Å	<i>E. coli</i> C43 (DE3)	DDM	Andrade <i>et al.</i> , 2005
<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	4KPP	CAX H ⁺ /Ca ²⁺ - Exchanger	2,30 Å	<i>E. coli</i> C41 (DE3)	DDM	Nishizawa <i>et al.</i> , 2013
<i>Methanocaldoc. Jannaschii</i>	3V5U	NCX Na ⁺ /Ca ²⁺ - Exchanger	1,90 Å 3,60 Å	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	DDM	Liao <i>et al.</i> , 2012
<i>Methanocaldoc. Jannaschii</i>	4EV6	CorA Magnesium- Transporter	3,20 Å	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) Rosetta	UDM	Guskov <i>et al.</i> , 2012
<i>Methanocaldoc. Jannaschii</i>	3GIA	ApcT Aminosäure- Transporter	2,32 Å	<i>E. coli</i> C41 (DE3)	DDM	Shaffer <i>et al.</i> , 2009
<i>Pyrococcus furiosus</i>	3VVN	MATE Multidrug- Transporter	2,45 Å	<i>E. coli</i> C41 (DE3) ΔacrB	DDM	Tanaka <i>et al.</i> , 2013
<i>Pyrococcus horikoshii</i>	1XFH	Glt _{Ph} Na ⁺ /Aspartat- symporter	3,50 Å	<i>E. coli</i> Top10 ECOMUT1	DM	Yernool <i>et al.</i> , 2004
<i>Thermococcus kodakarensis</i>	4KY0	Glt _{Tk} Substrat-frei	3,00 Å	<i>E. coli</i> MC1061	DDM	Jensen <i>et al.</i> , 2013

Die Untersuchung bzw. Kristallisation sekundärer Transporter in Archaeen scheint sich also im Allgemeinen eher schwierig zu gestalten. Nichtsdestotrotz bleibt die Strukturanalyse weiterhin eines der wichtigsten Werkzeuge zur Aufklärung von Transportvorgängen in *I. hospitalis* und *N. equitans*. Auch im Hinblick auf evolutionäre Entwicklungen ist gerade die Untersuchung von sekundären Transportern, wie z.B. den MFS Proteinen von *I. hospitalis*, generell äußerst interessant.

5 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein effizientes heterologes Expressionssystem für Membranproteine der beiden archaeellen Organismen *Ignicoccus hospitalis* und *Nanoarchaeum equitans* identifiziert und etabliert werden. Nach bioinformatischer Analyse wurden dafür zunächst geeignete Kandidaten aus beiden Organismen ausgewählt. Die Expression sollte sowohl in prokaryotischen als auch in eukaryotischen Wirtssystemen getestet werden.

Trotz verschiedener Optimierungsmaßnahmen war es nicht möglich, Membranproteine von *I. hospitalis* erfolgreich bzw. in hinreichender Qualität in *E. coli* überzuexprimieren. Auch die beiden hier verwendeten archaeellen Wirte eigneten sich nicht zur heterologen Expression. Ein Wechsel zu eukaryotischen Systemen lieferte unterschiedlichen Erfolg für die Expression des putativen MFS Transporters Iho0391. Während das Protein nur in mangelhafter Qualität in einer Insektenzelllinie rekombinant hergestellt werden konnte, führte die Expression in *P. pastoris* zu homologem Protein, welches mittels IMAC aufgereinigt und bereits für erste funktionelle Analysen verwendet werden konnte. Diese liefern zusammen mit dem erstellten Homologiemodell erste Hinweise auf eine mögliche ATP Transport Funktion durch Iho0391. Unter Umständen könnte durch das MFS Protein sogar ein Energietransport zu *N. equitans* vermittelt werden.

Im Genom von *I. hospitalis* wurden insgesamt acht MFS Transporter identifiziert und ihnen eine mögliche Beteiligung am Energietransport in *I. hospitalis* selbst bzw. zu seinem Symbionten *N. equitans* zugesprochen. Um Aufschlüsse über die Funktion von MFS Transportern aus *I. hospitalis* zu erhalten, wurde parallel versucht, homologe MFS Proteine aus anderen Archaeen heterolog in *E. coli* zu exprimieren. Die Wahl fiel dabei auf Tko1655 aus *T. kodakarensis*, ein Homolog zu Iho0800. Der MFS Transporter konnte bereits exprimiert und gereinigt werden, funktionelle Analysen wurden jedoch noch nicht durchgeführt. Das erstellte Homologiemodells deutet aber auf eine eventuelle Beteiligung des Transporters am Aminosäurestoffwechsel hin.

Die Expression des putativen C₄-Dicarboxylat Transporters Neq014 aus *N. equitans* war nach Codonoptimierung problemlos in *E. coli* möglich. Auch die Reinigung des Proteins konnte optimiert werden und erste Kristallisationsansätze wurden bereits gemacht. Eine mögliche Funktion von Neq014 als spannungsabhängiger Anionenkanal könnte mit der Regulation des Metaboliten- bzw. Energieflusses über die Membran von *N. equitans* einhergehen. Auch im Falle einer Trennung von seinem Wirt *I. hospitalis* könnte das Protein eine wichtige Rolle spielen.

Insgesamt betrachtet schaffen die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse die Grundlage für die Expression und Reinigung von Membranproteinen der archaeellen Organismen *I. hospitalis* und *N. equitans* und können als Startpunkt für weiterführende Untersuchungen genutzt werden.

6 Literaturverzeichnis

- Abramson, J., Smirnova, I., Kasho, V., Verner, G., Kaback, H. R. & Iwata, S. (2003). Structure and mechanism of the lactose permease of *Escherichia coli*. *Science* **301**, 610–615.
- Abu-Qarn, M., Eichler, J. & Sharon, N. (2008). Not just for Eukarya anymore: protein glycosylation in Bacteria and Archaea. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **18**, 544–550.
- Accardi, A. & Picollo, A. (2010). CLC channels and transporters: proteins with borderline personalities. *Biochim. Biophys. Acta* **1798**, 1457–1464.
- Agarraberes, F. A. & Dice, J. (2001). Protein translocation across membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **1513**, 1–24.
- Albers, S. V., Driessen, A. (2008). Membranes and Transport Proteins of Thermophilic Microorganisms. In *Thermophiles. Biology and technology at high temperatures*, 39–54. Edited by F. T. Robb. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Allers, T. & Mevarech, M. (2005). Archaeal genetics — the third way. *Nat. Rev. Genet.* **6**, 58–73.
- Almgren, M. (2000). Mixed micelles and other structures in the solubilization of bilayer lipid membranes by surfactants. *Biochim. Biophys. Acta* **1508**, 146–163.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nuc. Acids Res.* **25**, 3389–3402.
- Andrade, S. L. A., Dickmanns, A., Ficner, R. & Einsle, O. (2005). Crystal structure of the archaeal ammonium transporter Amt-1 from *Archaeoglobus fulgidus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 14994–14999.
- Basen, M., Sun, J. & Adams, M. W. W. (2012). Engineering a hyperthermophilic archaeon for temperature-dependent product formation. *mBio* **3**, e00053-12.
- Bateman, A. (1997). The structure of a domain common to archaeobacteria and the homocystinuria disease protein. *Trends Biochem. Sci.* **22**, 12–13.
- Bertani, G. (1951). Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **62**, 293–300.
- Bill, R. M. & von der Haar, T. (2015). Hijacked then lost in translation: the plight of the recombinant host cell in membrane protein structural biology projects. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **32**, 147–155.
- Bill, R. M., Henderson, P. J. F., Iwata, S., Kunji, E. R. S., Michel, H., Neutze, R., Newstead, S., Poolman, B., Tate, C. G. & Vogel, H. (2011). Overcoming barriers to membrane protein structure determination. *Nat. biotechnol.* **29**, 335–340.
- Bittner Philipp (2015). Expression and structural characterization of PII nitrogen regulatory proteins and its interaction partner. Masterarbeit, Universität Regensburg.

Blake, M. S., Johnston, K. H., Russell-Jones, G. J. & Gotschlich, E. C. (1984). A rapid, sensitive method for detection of alkaline phosphatase-conjugated anti-antibody on Western blots. *Anal. Biochem.* **136**, 175–179.

Blöchl, E., Rachel, R., Burggraf, S., Hafenbradl, D., Jannasch, H. W. & Stetter, K. O. (1997). *Pyrolobus fumarii*, gen. and sp. nov., represents a novel group of archaea, extending the upper temperature limit for life to 113 degrees C. *Extremophiles* **1**, 14–21.

Boer, H. A. de, Comstock, L. J. & Vasser, M. (1983). The tac promoter: a functional hybrid derived from the trp and lac promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 21–25.

Borch, J. & Hamann, T. (2009). The nanodisc: a novel tool for membrane protein studies. *Biol. Chem.* **390**, 805–814.

Bordogna, A., Pandini, A. & Bonati, L. (2011). Predicting the accuracy of protein-ligand docking on homology models. *J. Comput. Chem.* **32**, 81–98.

Boudker, O. & Verdon, G. (2010). Structural perspectives on secondary active transporters. *Trends Pharmacol. Sci.* **31**, 418–426.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254.

Burghardt, T., Näther, D. J., Junglas, B., Huber, H. & Rachel, R. (2007). The dominating outer membrane protein of the hyperthermophilic Archaeum *Ignicoccus hospitalis*: a novel pore-forming complex. *Mol. Microbiol.* **63**, 166–176.

Burney, S., Hoang, N., Caruso, M., Dudkin, E. A., Ahmad, M. & Bouly, J.-P. (2009). Conformational change induced by ATP binding correlates with enhanced biological function of *Arabidopsis* cryptochrome. *FEBS Letters* **583**, 1427–1433.

Byrne, B. (2015). *Pichia pastoris* as an expression host for membrane protein structural biology. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **32**, 9–17.

Cao, Y., Jin, X., Huang, H., Derebe, M. G., Levin, E. J., Kabaleeswaran, V., Pan, Y., Punta, M. & Love, J. Weng, J., Quick, M., Ye, S., Kloss, B., Bruni, R., Martinez-Hackert, E., Hendrickson, W. A., Rost, B., Javitch, J. A., Rajashankar, K. R., Jiang, Y., Zhou, M. (2011). Crystal structure of a potassium ion transporter, TrkH. *Nature* **471**, 336–340.

Carpenter, E. P., Beis, K., Cameron, A. D. & Iwata, S. (2008). Overcoming the challenges of membrane protein crystallography. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **18**, 581–586.

Chen, Y.-H., Hu, L., Punta, M., Bruni, R., Hillerich, B., Kloss, B., Rost, B., Love, J., Siegelbaum, S. A. & Hendrickson, W. A. (2010). Homologue structure of the SLAC1 anion channel for closing stomata in leaves. *Nature* **467**, 1074–1080.

Cherezov, V. (2011). Lipidic cubic phase technologies for membrane protein structural studies. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **21**, 559–566.

Cherezov, V., Rosenbaum, D. M., Hanson, M. A., Rasmussen, S. G. F., Thian, F. S., Kobilka, T. S., Choi, H.-J., Kuhn, P. & Weis, W. I., Kobilka, B. K., Stevens, R. C. (2007). High-resolution crystal structure of an engineered human beta2-adrenergic G protein-coupled receptor. *Science* **318**, 1258–1265.

- Corpet, F. (1988).** Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nuc. Acids Res.* **16**, 10881–10890.
- Costantini, A., Vaudano, E., Rantsiou, K., Cocolin, L. & Garcia-Moruno, E. (2011).** Quantitative expression analysis of mleP gene and two genes involved in the ABC transport system in *Oenococcus oeni* during rehydration. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **91**, 1601–1609.
- Crichton, P. G., Harding, M., Ruprecht, J. J., Lee, Y. & Kunji, E. R. S. (2013).** Lipid, Detergent, and Coomassie Blue G-250 Affect the Migration of Small Membrane Proteins in Blue Native Gels. *J. Biol. Chem.* **288**, 22163–22173.
- Dang, S., Sun, L., Huang, Y., Lu, F., Liu, Y., Gong, H., Wang, J. & Yan, N. (2010).** Structure of a fucose transporter in an outward-open conformation. *Nature* **467**, 734–738.
- Daxer, S. (2011).** Lokalisation stoffwechselrelevanter Enzymkomplexe sowie Anreicherung einer membrangebundenen Pyrophosphatase in Vertretern der archaeellen Gattung *Ignicoccus*. Masterarbeit, Universität Regensburg.
- Deng, D., Xu, C., Sun, P., Wu, J., Yan, C., Hu, M. & Yan, N. (2014).** Crystal structure of the human glucose transporter GLUT1. *Nature* **510**, 121–125.
- Doerrler, W. T., Sikdar, R., Kumar, S. & Boughner, L. A. (2013).** New functions for the ancient DedA membrane protein family. *J. Bacteriol.* **195**, 3–11.
- Dohán, O., La Vieja, A. de, Paroder, V., Riedel, C., Artani, M., Reed, M., Ginter, C. S. & Carrasco, N. (2003).** The sodium/iodide Symporter (NIS): characterization, regulation, and medical significance. *Endocrine Rev.* **24**, 48–77.
- Drew, D., Lerch, M., Kunji, E., Slotboom, D.-J. & Gier, J.-W. de (2006).** Optimization of membrane protein overexpression and purification using GFP fusions. *Nat. Methods* **3**, 303–313.
- Duee, E. D. & Vignais, P. V. (1965).** Echange entre adenine-nucleotides extra- et intramitochondriaux. *Biochim. Biophys. Acta* **107**, 184–188.
- Dutzler, R., Campbell, E. B., Cadene, M., Chait, B. T. & MacKinnon, R. (2002).** X-ray structure of a ClC chloride channel at 3.0 Å reveals the molecular basis of anion selectivity. *Nature* **415**, 287–294.
- Faham, S., Watanabe, A., Besserer, G. M., Cascio, D., Specht, A., Hirayama, B. A., Wright, E. M. & Abramson, J. (2008).** The crystal structure of a sodium galactose transporter reveals mechanistic insights into Na⁺/sugar symport. *Science* **321**, 810–814.
- Feng, L., Campbell, E. B., Hsiung, Y. & MacKinnon, R. (2010).** Structure of a eukaryotic CLC transporter defines an intermediate state in the transport cycle. *Science* **330**, 635–641.
- Fernández, F. J. & Vega, M. C. (2013).** Technologies to keep an eye on: alternative hosts for protein production in structural biology. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **23**, 365–373.
- Fiala, G. & Stetter, K. O. (1986).** *Pyrococcus furiosus* sp. nov. represents a novel genus of marine heterotrophic archaeobacteria growing optimally at 100 °C. *Arch. Microbiol.* **145**, 56–61.
- Finazzi, G., Chasen, C., Wollman, F.-A. & Vitry, C. de (2003).** Thylakoid targeting of Tat passenger proteins shows no delta pH dependence in vivo. *EMBO J.* **22**, 807–815.

Finn, R. D., Bateman, A., Clements, J., Coghill, P., Eberhardt, R. Y., Eddy, S. R., Heger, A., Hetherington, K. & Holm, L., Mistry, J., Sonnhammer, E. L. L., Tate, J. & Punta, M. (2014). Pfam: the protein families database. *Nuc. Acids Res.* **42**, D222–30.

Flechsler, J. (2015). A study on the CO₂ fixation pathway of *Ignicoccus hospitalis*. Dissertation, Universität Regensburg.

Fleischmann, R. D., Adams, M. D., White, O., Clayton, R. A., Kirkness, E. F., Kerlavage, A. R., Bult, C. J., Tomb, J. F., Dougherty, B. A. & Merrick, J. M. (1995). Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science* **269**, 496–512.

Flint, S. J. (2004). Principles of virology. Molecular biology, pathogenesis, and control of animal viruses, 2nd edn. Washington, DC: ASM Press.

Fuhrmann, M., Hausherr, A., Ferbitz, L., Schödl, T., Heitzer, M. & Hegemann, P. (2004). Monitoring dynamic expression of nuclear genes in *Chlamydomonas reinhardtii* by using a synthetic luciferase reporter gene. *Plant Mol Biol* **55**, 869–881.

Fukuda, M., Takeda, H., Kato, H. E., Doki, S., Ito, K., Maturana, A. D., Ishitani, R. & Nureki, O. (2015). Structural basis for dynamic mechanism of nitrate/nitrite antiport by NarK. *Nat. Commun.* **6**, 7097.

Gaberc-Porekar, V. & Menart, V. (2001). Perspectives of immobilized-metal affinity chromatography. *J. Biochem. Biophys. Meth.* **49**, 335–360.

Gao, X., Lu, F., Zhou, L., Dang, S., Sun, L., Li, X., Wang, J. & Shi, Y. (2009). Structure and mechanism of an amino acid antiporter. *Science* **324**, 1565–1568.

Gasteiger, E., Gattiker, A., Hoogland, C., Ivanyi, I., Appel, R. D. & Bairoch, A. (2003). ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nuc. Acids Res.* **31**, 3784–3788.

Geertsma, E. R., Groeneveld, M., Slotboom, D.-J. & Poolman, B. (2008). Quality control of overexpressed membrane proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 5722–5727.

Ghisaidoobe, A. B. T. & Chung, S. J. (2014). Intrinsic tryptophan fluorescence in the detection and analysis of proteins: a focus on Förster resonance energy transfer techniques. *Int. J. Mol. Sci.* **15**, 22518–22538.

Giannone, R. J., Huber, H., Karpinets, T., Heimerl, T., Küper, U., Rachel, R., Keller, M., Hettich, R. L. & Podar, M. (2011). Proteomic characterization of cellular and molecular processes that enable the *Nanoarchaeum equitans*-*Ignicoccus hospitalis* relationship. *PloS one* **6**, e22942.

Giannone, R. J., Wurch, L. L., Heimerl, T., Martin, S., Yang, Z., Huber, H., Rachel, R., Hettich, R. L. & Podar, M. (2015). Life on the edge: functional genomic response of *Ignicoccus hospitalis* to the presence of *Nanoarchaeum equitans*. *ISME J.* **9**, 101–114.

Goldberg, A. L. (2003). Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature* **426**, 895–899.

Goldman, E., Rosenberg, A. H., Zubay, G. & Studier, W. F. (1995). Consecutive Low-usage Leucine Codons Block Translation Only When Near the 5' End of a Message in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **245**, 467–473.

- Goldschmidt, L., Cooper, D. R., Derewenda, Z. S., & Eisenberg, D. (2007).** Toward rational protein crystallization: A Web server for the design of crystallizable protein variants. *Protein Sci.* **16** (8), 1569–1576.
- Gottesman, S. (1996).** Proteases and their targets in *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Genet.* **30**, 465–506.
- Gourdon, P., Andersen, J. L., Hein, K. L., Bublit, M., Pedersen, B. P., Liu, X.-Y., Yatime, L., Nyblom, M. & Nielsen, T. T., Olesen, C., Møller, J. V., Nissen, P., Morth, J. P. (2011).** HiLiDe—Systematic Approach to Membrane Protein Crystallization in Lipid and Detergent. *Cryst. Growth Des.* **11**, 2098–2106.
- Griffin, L., & Lawson, A. (2011).** Antibody fragments as tools in crystallography. *Clin. Exp. Immunol.* **165**(3), 285–291.
- Grobler, J., Bauer, F., Subden, R. E. & van Vuuren, H. J. (1995).** The *mae1* gene of *Schizosaccharomyces pombe* encodes a permease for malate and other C₄ dicarboxylic acids. *Yeast* **11**, 1485–1491.
- Guskov, A., Nordin, N., Reynaud, A., Engman, H., Lundbäck, A.-K., Jong, A. J. O., Cornvik, T., Phua, T. & Eshaghi, S. (2012).** Structural insights into the mechanisms of Mg²⁺ uptake, transport, and gating by CorA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**, 18459–18464.
- Gustafsson, C., Govindarajan, S. & Minshall, J. (2004).** Codon bias and heterologous protein expression. *Trends Biotechnol.* **22**, 346–353.
- Guzman, L. M., Belin, D., Carson, M. J. & Beckwith, J. (1995).** Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *J. Bacteriol.* **177**, 4121–4130.
- Hamilton, S., Odili, J., Pacifico, M. D., Wilson, G. D. & Kupsch, J.-M. (2003).** Effect of imidazole on the solubility of a his-tagged antibody fragment. *Hybrid. Hybridomics* **22**, 347–355.
- Hanahan, D. (1983).** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557–580.
- Hatch, T. P., Al-Hossainy, E. & Silverman, J. A. (1982).** Adenine nucleotide and lysine transport in *Chlamydia psittaci*. *J. Bacteriol.* **150**, 662–670.
- Hediger, M. A., Coady, M. J., Ikeda, T. S. & Wright, E. M. (1987).** Expression cloning and cDNA sequencing of the Na⁺/glucose co-transporter. *Nature* **330**, 379–381.
- Hedrich, R., Busch, H. & Raschke, K. (1990).** Ca²⁺ and nucleotide dependent regulation of voltage dependent anion channels in the plasma membrane of guard cells. *EMBO J.* **9**, 3889–3892.
- Heijne, G. von (1985).** Signal sequences. The limits of variation. *J. Mol. Biol.* **184**, 99–105.
- Heimerl, T. (2014).** *Ignicoccus* und *Nanoarchaeum*: 3D-Struktur und Proteom. Dissertation, Universität Regensburg.
- Hitchman, R. B., Possee, R. D., Crombie, A. T., Chambers, A., Ho, K., Siaterli, E., Lissina, O., Sternard, H., Novy, R., Loomis, K., Bird, L. E., Owens, R. J., King, L. A. (2010).** Genetic modification of a baculovirus vector for increased expression in insect cells. *Cell Biol. Toxicol.* **26**, 57–68.
- Hoenke, S., Schmid, M. & Dimroth, P. (1997).** Sequence of a gene cluster from *Klebsiella pneumoniae* encoding malonate decarboxylase and expression of the enzyme in *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem./FEBS* **246**, 530–538.

- Huber, H., Burggraf, S., Mayer, T., Wyschkony, I., Rachel, R. & Stetter, K. O. (2000). *Ignicoccus* gen. nov., a novel genus of hyperthermophilic, chemolithoautotrophic Archaea, represented by two new species, *Ignicoccus islandicus* sp. nov. and *Ignicoccus pacificus* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50** Pt 6, 2093–2100.
- Huber, H., Gallenberger, M., Jahn, U., Eylert, E., Berg, I. A., Kockelkorn, D., Eisenreich, W. & Fuchs, G. (2008). A dicarboxylate/4-hydroxybutyrate autotrophic carbon assimilation cycle in the hyperthermophilic Archaeum *Ignicoccus hospitalis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 7851–7856.
- Huber, H., Hohn, M. J., Rachel, R., Fuchs, T., Wimmer, V. C. & Stetter, K. O. (2002). A new phylum of Archaea represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont. *Nature* **417**, 63–67.
- Huber, H., Hohn, M. J., Stetter, K. O. & Rachel, R. (2003). The phylum *Nanoarchaeota*. Present knowledge and future perspectives of a unique form of life. *Res. Microbiol.* **154**, 165–171.
- Huber, H., Küper, U., Daxer, S. & Rachel, R. (2012). The unusual cell biology of the hyperthermophilic Crenarchaeon *Ignicoccus hospitalis*. *Antonie van Leeuwenhoek* **102**, 203–219.
- Inadome, H., Noda, Y., Kamimura, Y., Adachi, H. & Yoda, K. (2007). Tvp38, Tvp23, Tvp18 and Tvp15: novel membrane proteins in the Tlg2-containing Golgi/endosome compartments of *Saccharomyces cerevisiae*. *Exp. Cell Res.* **313**, 688–697.
- Inoue, H., Nojima, H. & Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**, 23–28.
- Jahn, U., Gallenberger, M., Paper, W., Junglas, B., Eisenreich, W., Stetter, K. O., Rachel, R. & Huber, H. (2008). *Nanoarchaeum equitans* and *Ignicoccus hospitalis*: new insights into a unique, intimate association of two archaea. *J. Bacteriol.* **190**, 1743–1750.
- Jahn, U., Huber, H., Eisenreich, W., Hügler, M. & Fuchs, G. (2007). Insights into the autotrophic CO₂ fixation pathway of the archaeon *Ignicoccus hospitalis*: comprehensive analysis of the central carbon metabolism. *J. Bacteriol.* **189**, 4108–4119.
- Jahn, U., Summons, R., Sturt, H., Grosjean, E. & Huber, H. (2004). Composition of the lipids of *Nanoarchaeum equitans* and their origin from its host *Ignicoccus* sp. strain KIN4/I. *Arch. Microbiol.* **182**, 404–413.
- Janosík, M., Kery, V., Gaustadnes, M., Maclean, K. N. & Kraus, J. P. (2001). Regulation of human cystathionine beta-synthase by S-adenosyl-L-methionine: evidence for two catalytically active conformations involving an autoinhibitory domain in the C-terminal region. *Biochemistry* **40**, 10625–10633.
- Jensen, S., Guskov, A., Rempel, S., Hänel, I. & Slotboom, D. J. (2013). Crystal structure of a substrate-free aspartate transporter. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **20**, 1224–1226.
- Jiang, D., Zhao, Y., Wang, X., Fan, J., Heng, J., Liu, X., Feng, W., Kang, X., Huang, B., Liu, J., Zhang, X. C. (2013). Structure of the YajR transporter suggests a transport mechanism based on the conserved motif A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **110**, 14664–14669.
- Junge, F., Schneider, B., Reckel, S., Schwarz, D., Dötsch, V. & Bernhard, F. (2008). Large-scale production of functional membrane proteins. *CMLS* **65**, 1729–1755.

- Junglas, B., Briegel, A., Burghardt, T., Walther, P., Wirth, R., Huber, H. & Rachel, R. (2008). *Ignicoccus hospitalis* and *Nanoarchaeum equitans*. Ultrastructure, cell–cell interaction, and 3D reconstruction from serial sections of freeze-substituted cells and by electron cryotomography. *Arch. Microbiol.* **190**, 395–408.
- Khafizov, K., Staritzbichler, R., Stamm, M. & Forrest, L. R. (2010). A study of the evolution of inverted-topology repeats from LeuT-fold transporters using AlignMe. *Biochemistry* **49**, 10702–10713.
- Kim, S. & Lee, S. B. (2006). Rare codon clusters at 5'-end influence heterologous expression of archaeal gene in *Escherichia coli*. *Protein Express. Purifi.* **50**, 49–57.
- Klingenberg, M. (1989). Molecular aspects of the adenine nucleotide carrier from mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* **270**, 1–14.
- König, A. (2014). *Ignicoccus hospitalis* als Quelle neuartiger Hydrolasen für die Biokatalyse. Masterarbeit, Universität Hamburg.
- Könneke, M., Schubert, D. M., Brown, P. C., Hügler, M., Standfest, S., Schwander, T., Schada von Borzyskowski, L., Erb, T. J., Stahl, D. A. & Berg, I. A. (2014). Ammonia-oxidizing archaea use the most energy-efficient aerobic pathway for CO₂ fixation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **111**, 8239–8244.
- Kreuter, L. J. (2014). Isolierung, Charakterisierung und Lokalisierung der ATP-Synthasen der archaeellen Genera *Ignicoccus* und *Nanoarchaeum*. Dissertation, Universität Regensburg.
- Krogh, A., Larsson, B., Heijne, G. von & Sonnhammer, E. L. (2001). Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J. Mol. Biol.* **305**, 567–580.
- Kühlbrandt, W., Williams, K. A. (1999). Analysis of macromolecular structure and dynamics by electron cryo-microscopy. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **3** (5), 537–543.
- Labarre, C., van Tilbeurgh, H. & Blondeau, K. (2007). *Pichia pastoris* is a valuable host for the expression of genes encoding membrane proteins from the hyperthermophilic Archeon *Pyrococcus abyssi*. *Extremophiles* **11**, 403–413.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685.
- Lange, M. (2009). Neue Hochtemperatur-Organismen von Lesbos und dem Ostpazifischen-Rücken. Zulassungsarbeit, Universität Regensburg.
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J., Higgins, D. G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23**, 2947–2948.
- Law, C. J., Maloney, P. C. & Wang, D.-N. (2008). Ins and outs of major facilitator superfamily antiporters. *Annu. Rev. Microbiol.* **62**, 289–305.
- Le Maire, M., Champeil, P. & Møller, J. V. (2000). Interaction of membrane proteins and lipids with solubilizing detergents. *Biochim. Biophys. Acta* **1508**, 86–111.
- Leigh, J. A., Albers, S.-V., Atomi, H. & Allers, T. (2011). Model organisms for genetics in the domain Archaea: methanogens, halophiles, Thermococcales and Sulfolobales. *FEMS Microbiol. Rev.* **35**, 577–608.

- Lemieux, M. J., Huang, Y. & Wang, D. N. (2005).** Crystal structure and mechanism of GlpT, the glycerol-3-phosphate transporter from *E. coli*. *J. Electron Microsc.* **54 Suppl 1**, i43-6.
- Lessner, D. J., Lhu, L., Wahal, C. S. & Ferry, J. G. (2010).** An engineered methanogenic pathway derived from the domains Bacteria and Archaea. *mBio* **1 (5)**, e00243-10.
- Liao, J., Li, H., Zeng, W., Sauer, D. B., Belmares, R. & Jiang, Y. (2012).** Structural insight into the ion-exchange mechanism of the sodium/calcium exchanger. *Science* **335**, 686–690.
- Lowe, S. L., Peter, F., Subramaniam, V. N., Wong, S. H. & Hong, W. (1997).** A SNARE involved in protein transport through the Golgi apparatus. *Nature* **389**, 881–884.
- Ma, P., Varela, F., Magoch, M., Silva, A. R., Rosário, A. L., Brito, J., Oliveira, T. F., Nogly, P., Pessanha, M., Stelter, M., Kletzin, A., Henderson, P. J., Archer, M. (2013).** An efficient strategy for small-scale screening and production of archaeal membrane transport proteins in *Escherichia coli*. *PloS one* **8**, e76913.
- Madej, M. G., Dang, S., Yan, N. & Kaback, H. R. (2013).** Evolutionary mix-and-match with MFS transporters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **110**, 5870–5874.
- Madej, M. G. & Kaback, H. R. (2013).** Evolutionary mix-and-match with MFS transporters II. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **110**, 4831-4838.
- Mandel, M. & Higa, A. (1970).** Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.* **53**, 159–162.
- Martí-Renom, M. A., Stuart, A. C., Fiser, A., Sánchez, R., Melo, F. & Sali, A. (2000).** Comparative protein structure modeling of genes and genomes. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **29**, 291–325.
- Martoglio, B. & Dobberstein, B. (1998).** Signal sequences: more than just greasy peptides. *Trends Cell Biol.* **8**, 410–415.
- Mayer, F., Küper, U., Meyer, C., Daxer, S., Müller, V., Rachel, R. & Huber, H. (2012).** AMP-forming acetyl coenzyme A synthetase in the outermost membrane of the hyperthermophilic crenarchaeon *Ignicoccus hospitalis*. *J. Bacteriol.* **194**, 1572–1581.
- Meyer, C., Heimerl, T., Wirth, R., Klingl, A. & Rachel, R. (2014).** The Iho670 fibers of *Ignicoccus hospitalis* are anchored in the cell by a spherical structure located beneath the inner membrane. *J. Bacteriol.* **196**, 3807–3815.
- Miller, A. & Tanner, J. (2009).** Fluorescence spectroscopy. In *Essentials of chemical biology. Structure and dynamics of biological macromolecules*, 196–197. Edited by A. Miller & J. Tanner. Chichester: Wiley.
- Mindell, J. A. & Maduke, M. (2001).** CIC chloride channels. *Genome Biol.* **2**, 3003.1–3003.6.
- Miroux, B. & Walker, J. E. (1996).** Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *J. Mol. Biol.* **260**, 289–298.
- Morbach, S. & Krämer, R. (2000).** Mechanosensitive Kanäle: Ein Bakterium lässt Dampf ab. *Biospektrum* **6**, 377–379.

- Mori, H. & Cline, K. (2002).** A twin arginine signal peptide and the pH gradient trigger reversible assembly of the thylakoid [Delta]pH/Tat translocase. *J. Cell Biol.* **157**, 205–210.
- Müller, D. W., Meyer, C., Gürster, S., Küper, U., Huber, H., Rachel, R., Wanner, G., Wirth, R. & Bellack, A. (2009).** The Iho670 fibers of *Ignicoccus hospitalis*: a new type of archaeal cell surface appendage. *J. Bacteriol.* **191**, 6465–6468.
- Nakamura, S., Suzuki, H. & Kanazawa, T. (1994).** The ATP-induced change of tryptophan fluorescence reflects a conformational change upon formation of ADP-sensitive phosphoenzyme in the sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase. Stopped-flow spectrofluorometry and continuous flow-rapid quenching method. *J. Biol. Chem.* **269**, 16015–16019.
- Naroditskaya, V., Schlosser, M. J., Fang, N. Y. & Lewis, K. (1993).** An *E. coli* gene *emrD* is involved in adaptation to low energy shock. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **196**, 803–809.
- Nath, A., Atkins, W. M. & Sligar, S. G. (2007).** Applications of phospholipid bilayer nanodiscs in the study of membranes and membrane proteins. *Biochemistry* **46**, 2059–2069.
- Näther, D. J. & Rachel, R. (2004).** The outer membrane of the hyperthermophilic archaeon *Ignicoccus*: dynamics, ultrastructure and composition. *Biochem. Soc. T.* **32**, 199–203.
- Nelson, D. R., Lawson, J. E., Klingenberg, M. & Douglas, M. G. (1993).** Site-directed mutagenesis of the yeast mitochondrial ADP/ATP translocator. Six arginines and one lysine are essential. *J. Mol. Biol.* **230**, 1159–1170.
- Neuhaus, H. E., Thom, E., Möhlmann, T., Steup, M. & Kampfenkel, K. (1997).** Characterization of a novel eukaryotic ATP/ADP translocator located in the plastid envelope of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **11**, 73–82.
- Nieba, L., Nieba-Axmann, S. E., Persson, A., Hämäläinen, M., Edebratt, F., Hansson, A., Lidholm, J., Magnusson, K., Karlsson, A. F. & Plückthun, A. (1997).** BIACORE analysis of histidine-tagged proteins using a chelating NTA sensor chip. *Anal. Biochem.* **252**, 217–228.
- Nishihara, K., Kanemori, M., Kitagawa, M., Yanagi, H. & Yura, T. (1998).** Chaperone Coexpression Plasmids: Differential and Synergistic Roles of DnaK-DnaJ-GrpE and GroEL-GroES in Assisting Folding of an Allergen of Japanese Cedar Pollen, Cryj2, in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 1694–1699.
- Nishino, K. & Yamaguchi, A. (2001).** Analysis of a complete library of putative drug transporter genes in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **183**, 5803–5812.
- Nishizawa, T., Kita, S., Maturana, A. D., Furuya, N., Hirata, K., Kasuya, G., Ogasawara, S., Dohmae, N., Iwamoto, T., Ishitani, R., Nureki, O. (2013).** Structural basis for the counter-transport mechanism of a H⁺/Ca²⁺ exchanger. *Science* **341**, 168–172.
- Opekarová, M. & Tanner, W. (2003).** Specific lipid requirements of membrane proteins—a putative bottleneck in heterologous expression. *Biochim. Biophys. Acta* **1610**, 11–22.
- Oxford Expression Technologies (2008).** flashBAC One Step Baculovirus Protein Expression User Guide. http://www.bionovuslifesciences.com.au/images/stories/file/OET/pdf/OET_flashBAC_detailed_protocol.pdf.

- Pao, S. S., Paulsen, I. T. & Saier, M. H. (1998). Major facilitator superfamily. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 1–34.
- Paper, W., Jahn, U., Hohn, M. J., Kronner, M., Näther, D. J., Burghardt, T., Rachel, R., Stetter, K. O. & Huber, H. (2007). *Ignicoccus hospitalis* sp. nov., the host of '*Nanoarchaeum equitans*'. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **57**, 803–808.
- Park, H. & Bakalinsky, A. T. (2000). SSU1 mediates sulphite efflux in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **16**, 881–888.
- Paulsen, I. T., Brown, M. H. & Skurray, R. A. (1996). Proton-dependent multidrug efflux systems. *Microbiol. Rev.* **60**, 575–608.
- Pebay-Peyroula, E., Dahout-Gonzalez, C., Kahn, R., Trézéguet, V., Lauquin, G. J.-M. & Brandolin, G. (2003). Structure of mitochondrial ADP/ATP carrier in complex with carboxyatractyloside. *Nature* **426**, 39–44.
- Plobner, K. (2014). Struktur und Funktion von archaeellen MFS Transportern. Bachelorarbeit, Universität Regensburg.
- Podar, M., Anderson, I., Makarova, K. S., Elkins, J. G., Ivanova, N., Wall, M. A., Lykidis, A., Mavromatis, K., Sun, H., Hudson, M. E., Chen, W., Deciu, C., Hutchison, D., Eads, J. R., Anderson, A., Fernandes, F., Szeto, E., Lapidus, A., Kyrpides, N. C., Saier, M. H., Richardson, P. M., Rachel, R., Huber, H., Eisen, J. A., Koonin, E. V., Keller, M. & Stetter, K. O. (2008). A genomic analysis of the archaeal system *Ignicoccus hospitalis*-*Nanoarchaeum equitans*. *Genome Biol.* **9**, R158.1–R158.18.
- Podar, M., Makarova, K. S., Graham, D. E., Wolf, Y. I., Koonin, E. V. & Reysenbach, A.-L. (2013). Insights into archaeal evolution and symbiosis from the genomes of a nanoarchaeon and its inferred crenarchaeal host from Obsidian Pool, Yellowstone National Park. *Biology direct* **8**: 9.
- Rachel, R., Meyer, C., Klingl, A., Gürster, S., Heimerl, T., Wasserburger, N., Burghardt, T., Küper, U. & Bellack, A., Schopf, S., Wirth, R., Huber, H., Wanner, G. (2010). Analysis of the Ultrastructure of Archaea by Electron Microscopy. *Methods Cell Biol.* **96**, 47–69.
- Rachel, R., Wyschkony, I., Riehl, S. & Huber, H. (2002). The ultrastructure of *Ignicoccus*. Evidence for a novel outer membrane and for intracellular vesicle budding in an archaeon. *Archaea* **1**, 9–18.
- Raicu, V., Singh, D. R. (2013). FRET spectrometry: a new tool for the determination of protein quaternary structure in living cells. *Biophys J.* **105** (9), 1937–45.
- Rath, A., Glibowicka, M., Nadeau, V. G., Chen, G. & Deber, C. M. (2009). Detergent binding explains anomalous SDS-PAGE migration of membrane proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 1760–1765.
- Reddy, V. S., Shlykov, M. A., Castillo, R., Sun, E. I. & Saier, M. H. (2012). The major facilitator superfamily (MFS) revisited. *FEBS J.* **279**, 2022–2035.
- Reinhardt, D., Pesce, E.-R., Stieger, P., Mandel, T., Baltensperger, K., Bennett, M., Traas, J., Friml, J. & Kuhlemeier, C. (2003). Regulation of phyllotaxis by polar auxin transport. *Nature* **426**, 255–260.
- Ren, Q., Kang, K. H. & Paulsen, I. T. (2004). TransportDB: a relational database of cellular membrane transport systems. *Nuc. Acids Res.* **32**, D284–8.
- Ren, Q. & Paulsen, I. T. (2005). Comparative analyses of fundamental differences in membrane transport capabilities in prokaryotes and eukaryotes. *PLoS Comput. Biol.* **1**, e27.

- Robert, X. & Gouet, P. (2014).** Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. *Nuc. Acids Res.* **42**, W320-4.
- Roosild, T. P., Greenwald, J., Vega, M., Castronovo, S., Riek, R. & Choe, S. (2005).** NMR structure of Mistic, a membrane-integrating protein for membrane protein expression. *Science* **307**, 1317–1321.
- Rosenberg, A. H., Goldman, E., Dunn, J. J., Studier, F. W. & Zubay, G. (1993).** Effects of consecutive AGG codons on translation in *Escherichia coli*, demonstrated with a versatile codon test system. *J. Bacteriol.* **175**, 716–722.
- Rother, M. & Metcalf, W. W. (2005).** Genetic technologies for Archaea. *Curr. Opin. Microbiol.* **8**, 745–751.
- Saier, M. H. (2000).** Families of transmembrane transporters selective for amino acids and their derivatives. *Microbiology* **146** (8), 1775–1795.
- Saier, M. H., Tran, C. V. & Barabote, R. D. (2006).** TCDB: the Transporter Classification Database for membrane transport protein analyses and information. *Nuc. Acids Res.* **34**, D181-6.
- Sánchez, R., Pieper, U., Melo, F., Eswar, N., Martí-Renom, M. A., Madhusudhan, M. S., Mirković, N. & Sali, A. (2000).** Protein structure modeling for structural genomics. *Nat. Struct. Biol.* **7**, 986–990.
- Saraste, M. & Walker, J. E. (1982).** Internal sequence repeats and the path of polypeptide in mitochondrial ADP/ATP translocase. *FEBS Letters* **144**, 250–254.
- Schneider, E., Wilken, S. & Schmid, R. (1994).** Nucleotide-induced conformational changes of MalK, a bacterial ATP binding cassette transporter protein. *J. Biol. Chem.* **269**, 20456–20461.
- Schneider, K. L., Pollard, K. S., Baertsch, R., Pohl, A. & Lowe, T. M. (2006).** The UCSC Archaeal Genome Browser. *Nuc. Acids Res.* **34**, D407-10.
- Schnoes, A. M., Brown, S. D., Dodevski, I. & Babbitt, P. C. (2009).** Annotation error in public databases: misannotation of molecular function in enzyme superfamilies. *PLoS Comput. Biol.* **5**, e1000605.
- Schroeder, J. I. & Hedrich, R. (1989).** Involvement of ion channels and active transport in osmoregulation and signaling of higher plant cells. *Trends Biochem. Sci.* **14**, 187–192.
- Schuster, K. U. (2003).** Der Surface Layer von "*Nanoarchaeum equitans*": Elektronenmikroskopische, proteinbiochemische und immunologische Untersuchungen. Diplomarbeit, Universität Regensburg.
- Schweikhard, E. S. & Ziegler, C. M. (2012).** Amino acid secondary transporters: toward a common transport mechanism. *Curr. Top. Membr.* **70**, 1–28.
- Schweikhard, E. S. (2013).** Na⁺-coupled betaine symporters involved in osmotic stress response in prokaryotes and eukaryotes. Dissertation, Universität Mainz.
- Seddon, A. M., Curnow, P. & Booth, P. J. (2004).** Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera. *Biochim. Biophys. Acta* **1666**, 105–117.
- Shaffer, P. L., Goehring, A., Shankaranarayanan, A. & Gouaux, E. (2009).** Structure and mechanism of a Na⁺-independent amino acid transporter. *Science* **325**, 1010–1014.
- Shapiro, A. L., Viñuela, E. & V. Maizel, J. (1967).** Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **28**, 815–820.

Simossis, V. A. & Heringa, J. (2005). PRALINE: a multiple sequence alignment toolbox that integrates homology-extended and secondary structure information. *Nuc. Acids Res.* **33**, W289-94.

Slabinski, L., Jaroszewski, L., Rychlewski, L., Wilson, I. A., Lesley, S. A. & Godzik, A. (2007). XtalPred: a web server for prediction of protein crystallizability. *Bioinformatics* **23**, 3403–3405.

Slotboom, D. J., Duurkens, R. H., Olieman, K. & Erkens, G. B. (2008). Static light scattering to characterize membrane proteins in detergent solution. *Methods* **46**, 73–82.

Smith, J. D. & Robinson, A. S. (2002). Overexpression of an archaeal protein in yeast: secretion bottleneck at the ER. *Biotech. Bioeng.* **79**, 713–723.

Snyder, D. A., Chen, Y., Denissova, N. G., Acton, T., Aramini, J. M., Ciano, M., Karlin, R., Liu, J., Manor, P., Rajan, P. A., Rossi, P., Swapna, G. V., Xiao, R., Rost, B., Hunt, J., Montelione, G. T. (2005). Comparisons of NMR spectral quality and success in crystallization demonstrate that NMR and X-ray crystallography are complementary methods for small protein structure determination. *J. Am. Chem. Soc.* **127(47)**, 16505–11.

Stappen, R. & Krämer, R. (1994). Kinetic mechanism of phosphate/phosphate and phosphate/OH⁻ antiports catalyzed by reconstituted phosphate carrier from beef heart mitochondria. *J. Biol. Chem.* **269**, 11240–11246.

Stetter, K. O., König, H. & Stackebrandt, E. (1983). *Pyrodictium* gen. nov., a New Genus of Submarine Disc-Shaped Sulphur Reducing Archaeobacteria Growing Optimally at 105 °C. *Syst. Appl. Microbiol.* **4**, 535–551.

Stewart, R. C. (2005). Analysis of ATP binding to CheA containing tryptophan substitutions near the active site. *Biochemistry* **44**, 4375–4385.

Studier, F. W. & Moffatt, B. A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* **189**, 113–130.

Sun, J., Bankston, J. R., Payandeh, J., Hinds, T. R., Zagotta, W. N. & Zheng, N. (2014). Crystal structure of the plant dual-affinity nitrate transporter NRT1.1. *Nature* **507**, 73–77.

Takemasa, R., Yokooji, Y., Yamatsu, A., Atomi, H. & Imanaka, T. (2011). *Thermococcus kodakarensis* as a host for gene expression and protein secretion. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**, 2392–2398.

Tanaka, Y., Hipolito, C. J., Maturana, A. D., Ito, K., Kuroda, T., Higuchi, T., Katoh, T., Kato, H. E., Hattori, M., Kumazaki, K., Tsukazaki, T., Ishitani, R., Suga, H., Nureki, O. (2013). Structural basis for the drug extrusion mechanism by a MATE multidrug transporter. *Nature* **496**, 247–251.

Terpe, K. (2006). Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl. Microbiol. Biotech.* **72**, 211–222.

Tjaden, J., Winkler, H. H., Schwöppe, C., van der Laan, M., Möhlmann, T. & Neuhaus, H. E. (1999). Two nucleotide transport proteins in *Chlamydia trachomatis*, one for the nucleoside triphosphate uptake and the other for transport of energy. *J. Bacteriol.* **181**, 1196–1202.

Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 4350–4354.

- Tramontano, A. (1998).** Homology modeling with low sequence identity. *Methods* **14**, 293–300.
- Trentmann, O., Jung, B., Neuhaus, H. E. & Haferkamp, I. (2008).** Nonmitochondrial ATP/ADP transporters accept phosphate as third substrate. *J. Biol. Chem.* **283**, 36486–36493.
- Tsaousis, A. D., Kunji, E. R. S., Goldberg, A. V., Lucocq, J. M., Hirt, R. P. & Embley, T. M. (2008).** A novel route for ATP acquisition by the remnant mitochondria of *Encephalitozoon cuniculi*. *Nature* **453**, 553–556.
- Tusnady, G. E. & Simon, I. (1998).** Principles governing amino acid composition of integral membrane proteins: application to topology prediction. *J. Mol. Biol.* **283**, 489–506.
- Ubarretxena-Belandia, I., & Stokes, D. L. (2010).** Present and future of membrane protein structure determination by electron crystallography. *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.* **81**, 33–60.
- van Niftrik, L. A., Fuerst, J. A., Sinninghe Damste, J. S., Kuenen, J. G., Jetten, M. S. M. & Strous, M. (2004).** The anammoxosome: an intracytoplasmic compartment in anammox bacteria. *FEMS Microbiol. Letters* **233**, 7–13.
- Vieille, C. & Zeikus, G. J. (2001).** Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **65**, 1–43.
- Vieira-Pires, R. S., Szollosi, A. & Morais-Cabral, J. H. (2013).** The structure of the KtrAB potassium transporter. *Nature* **496**, 323–328.
- Villeret, V., Clantin, B., Tricot, C., Legrain, C., Roovers, M., Stalon, V., Glansdorff, N. & van Beeumen, J. (1998).** The crystal structure of *Pyrococcus furiosus* ornithine carbamoyltransferase reveals a key role for oligomerization in enzyme stability at extremely high temperatures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 2801–2806.
- Waage, I., Schmid, G., Thumann, S., Thomm, M. & Hausner, W. (2010).** Shuttle vector-based transformation system for *Pyrococcus furiosus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 3308–3313.
- Walter, E. G., Weiner, J. H. & Taylor, D. E. (1991).** Nucleotide sequence and overexpression of the tellurite-resistance determinant from the IncHII plasmid pHH1508a. *Gene* **101**, 1–7.
- Wang, Y. (2002).** The function of OmpA in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **292**, 396–401.
- Waters, E., Hohn, M. J., Ahel, I., Graham, D. E., Adams, M. D., Barnstead, M., Beeson, K. Y., Bibbs, L., Bolanos, R., Keller, M., Kretz, K., Lin, X., Mathur, E., Ni, J., Podar, M., Richardson, T., Sutton, G. G., Simon, M., Soll, D., Stetter, K. O., Short, J. M., Noordewier, M. (2003).** The genome of *Nanoarchaeum equitans*: insights into early archaeal evolution and derived parasitism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 12984–12988.
- Wickner, W. & Schekman, R. (2005).** Protein translocation across biological membranes. *Science* **310**, 1452–1456.
- Wiegmann, P. (2013).** Heterologe Expression von Membranproteinen des hyperthermophilen Crenarchaeons *Ignicoccus hospitalis* sowie Expression und Aufreinigung eines mechanosensitiven Kanals von *Nanoarchaeum equitans*. Masterarbeit, Universität Regensburg.
- Wittig, I., Beckhaus, T., Wumaier, Z., Karas, M. & Schägger, H. (2010).** Mass estimation of native proteins by blue native electrophoresis: principles and practical hints. *Mol. Cell. Prot.* **9**, 2149–2161.

- Wittig, I., Braun, H.-P. & Schägger, H. (2006).** Blue native PAGE. *Nature Prot.* **1**, 418–428.
- Wittig, I. & Schägger, H. (2005).** Advantages and limitations of clear-native PAGE. *Proteomics* **5**, 4338–4346.
- Wittig, I. & Schägger, H. (2009).** Native electrophoretic techniques to identify protein-protein interactions. *Proteomics* **9**, 5214–5223.
- Wright, E. M., Loo, D. D. F., Hirayama, B. A. & Turk, E. (2004).** Surprising versatility of Na⁺-glucose cotransporters: SLC5. *Physiology* **19**, 370–376.
- Wu, C. C. & Yates, J. R. (2003).** The application of mass spectrometry to membrane proteomics. *Nature Biotech.* **21**, 262–267.
- Yan, N. (2013).** Structural advances for the major facilitator superfamily (MFS) transporters. *Trends Biochem. Sci.* **38**, 151–159.
- Yernool, D., Boudker, O., Jin, Y. & Gouaux, E. (2004).** Structure of a glutamate transporter homologue from *Pyrococcus horikoshii*. *Nature* **431**, 811–818.
- Zillner, K., Jerabek-Willemsen, M., Duhr, S., Braun, D., Längst, G. & Baaske, P. (2012).** Microscale Thermophoresis as a Sensitive Method to Quantify Protein: Nucleic Acid Interactions in Solution. *Funct. Genomics* **1**, 241–252.

7 Anhang

A Abkürzungsverzeichnis

(v/v)	<i>volume per volume</i>
(w/v)	<i>weight per volume</i>
(w/w)	<i>weight per weight</i>
°C	Grad Celsius
2D	Zweidimensional
3D	Dreidimensional
Å	Angström
AAC	ATP/ADP-Carrier
ABA	Abscisinsäure (<i>abscisic acid</i>)
AcNPV	<i>Autographa californica nuclear polyhedrosis virus</i>
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BCA	Bicinchoninsäure (<i>bicinchoninic acid</i>)
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat
Bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)Dimethylammonio]-1-Propansulfonat

Cmc	kritische Mizellbildungskonzentration (<i>critical micelle concentration</i>)
CIP	Calf-Intestine-Phosphatase
Cym5	2,2-bis(3'-Cyclohexylpropyl) Propan-1,3-bis- β -D-Maltopyranosid
Cym6	6-Cyclohexyl-1-Hexyl- β -D-Maltosid
C/N-Term	C/N-terminal
DAPI	4',6-Diamidin-2-Phenylindol
DDM	n-Dodecyl β -Maltosid
DDMAO	Dodecylmethylaminoxid
DM	n-Decyl- β -D-Maltopyranosid
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
<i>et al.</i>	<i>et alii/et aliae</i> (und andere)
FBS	fetales Kälberserum (<i>fetal bovine serum</i>)
Fos12	n-Dodecylphosphocholin
Fos14	n-Tetradecylphosphocholin
gDNA	genomische Desoxyribonukleinsäure
GFP	grünfluoreszierendes Protein (<i>green fluorescent protein</i>)
h	Stunde(n) (<i>hours</i>)
IgG	Immunglobulin G
IM	innere Membran (<i>inner membrane</i>)
IMAC	Immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie
IMC	Intermembran-Kompartiment (<i>intermembrane compartment</i>)
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid

Kan	Kanamycin
kbar	Kilobar
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
l	Liter
LDAO	Lauryldimethylamine-N-Oxid
LMNG	Lauryl Maltose Neopentyl Glycol
MALDI-TOF	<i>matrix assisted laser desorption ionization – time of flight</i>
mAU	<i>milli absorption units</i>
MFS	Major Facilitator Superfamilie
min	Minuten
ml	Milliliter
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
mRNA	Boten-RNA (<i>messenger RNA</i>)
MW	Molekulargewicht (<i>molecular weight</i>)
MS/MS	Massenspektrometrie/Massenspektrometrie
Na-C	Natriumcholat
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
ng	Nanogramm
NG	n-Nonyl- β -D-Glucopyranosid
nm	Nanometer
NM	n-Nonyl- β -D-Maltopyranosid
NTA	Nitrilotriessigsäure
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
OG	n-Octyl- β -D-Glucopyranosid

p.A.	zur Analyse (<i>pro analysi</i>)
PEG	Polyethylenglycol
pg	Picogramm
PIPES	Piperazin-N,N'-bis(2-Ethansulfonsäure)
RFU	relative Fluoreszenzeinheiten (<i>fluorescence units</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SEC	Größenausschlusschromatographie (<i>size-exclusion chromatography</i>)
sek	Sekunden
SLAC	<i>slow anion channel(s)</i>
SNARE	<i>soluble NSF attachment protein receptor</i>
SP	Signalpeptid(e)
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TMH	Transmembranhelix/-helices
Tris	Tris(hydroxymethyl-)aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
U	Einheiten (<i>units</i>)
UDM	n-Undecyl- β -Maltosid
üN	über Nacht
YNB	<i>Yeast Nitrogen Base</i>
μ g	Microgramm
μ l	Microliter
μ m	Micrometer

Chemische Elemente wurden gemäß der IUPAC-Richtlinien verwendet.

<u>Aminosäure</u>	<u>Einbuchstaben-Code</u>	<u>Dreibuchstaben-Code</u>
Alanin	A	Ala
Cystein	C	Cys
Aspartat	D	Asp
Glutamat	E	Glu
Phenylalanin	F	Phe
Glycin	G	Gly
Histidin	H	His
Isoleucin	I	Ile
Lysin	K	Lys
Leucin	L	Leu
Methionin	M	Met
Asparagin	N	Asn
Prolin	P	Pro
Glutamin	Q	Gln
Arginin	R	Arg
Serin	S	Ser
Threonin	T	Thr
Valin	V	Val
Tryptophan	W	Trp
Tyrosin	Y	Tyr

B Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der verschiedenen Transporterklassen	2
Abbildung 2: Bildung des MFS-Folds	10
Abbildung 3: Schematische Darstellung des Transportvorganges nach dem „Alternating Access“ Mechanismus	11
Abbildung 4: Funktionelle Kompartimentierung in <i>I. hospitalis</i>	13
Abbildung 5: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von <i>N. equitans</i>	16
Abbildung 6: Struktur des mitochondrialen ADP/ATP-Carriers	18

Abbildung 7: Schematische Darstellung zur Herstellung rekombinanter Baculovirus DNA durch homologe Rekombination mittels flashBAC™ System	51
Abbildung 8: Expression der codonoptimierten Membranproteine Iho0192, Iho0454, Iho0573, Iho1095 und Iho1222 in <i>E. coli</i> BL21 (DE3).....	64
Abbildung 9: Expression der MFS Transporter Iho0800, Iho1008 in <i>E. coli</i> Rosetta™ 2 (DE3)	65
Abbildung 10: Nachweis der Expression von Tko1655 in Membranen von <i>E. coli</i>	69
Abbildung 11: Solubilisierung von Tko1655 mit verschiedenen Detergenzien.	70
Abbildung 12: IMAC von Tko1655 im Batch-Verfahren mit TALON	70
Abbildung 13: Homologie- und Topologiemodell von Iho0391.....	72
Abbildung 14: Docking Experiment mit Iho0391 und ATP	73
Abbildung 15: Präparierte Membranen von <i>E. coli</i> BL21 und C43 nach Expression von Iho0391	75
Abbildung 16: Solubilisierung von Iho0391 mit verschiedenen Detergenzien.....	76
Abbildung 17: Aufreinigung von Iho0391 nach Solubilisierung mit DDM über Dynabeads®	77
Abbildung 18: Expression von Iho0391 in Sf9 Zellen nach Infektion mit verschiedenen Viruskonzentrationen .	79
Abbildung 19: Expression von BGT-1 in Sf9 Zellen	80
Abbildung 20: Nachweis der Expression von Iho0391 in Membranen von <i>P. pastoris</i> Klonen	81
Abbildung 21: Test verschiedener Methanolkonzentrationen im Expressionsmedium.....	82
Abbildung 22: Solubilisierung von Iho0391 mit verschiedenen Detergenzien.....	82
Abbildung 23: Aufreinigung von Iho0391 im Batch-Verfahren nach Solubilisierung mit NG	83
Abbildung 24: IMAC von Iho0391 im Durchlauf-Verfahren.....	84
Abbildung 25: SEC von Iho0391.....	84
Abbildung 26: SEC von Iho0391 in Abhängigkeit von Mg-ATP	85
Abbildung 27: Tryptophan-Fluoreszenzmessung von Iho0391 in Abhängigkeit von Mg-ATP	86
Abbildung 28: Immunlokalisation von Iho0391 und Spezifitätsnachweis des Antikörpers anti-Iho0391	87
Abbildung 29: Nachweis der Expression von Neq014 in Membranen von <i>E. coli</i>	89
Abbildung 30: Solubilisierung von Neq014 mit verschiedenen Detergenzien	90
Abbildung 31: Temperaturgradienten nach Solubilisierung von Neq014 mit DDM.....	90
Abbildung 32: Nachweis der Expression von Neq014 in Membranen von <i>E. coli</i>	91
Abbildung 33: IMAC von Neq014 im Durchlauf-Verfahren	92
Abbildung 34: Proteinkristalle von Neq014.....	93
Abbildung 35: Solubilisierung von Neq014 (codonoptimiert) mit verschiedenen Detergenzien.....	94
Abbildung 36: IMAC von Neq014 im Durchlauf-Verfahren	95
Abbildung 37: SEC von Neq014 (codonoptimiert).....	96
Abbildung 38: Native-PAGEs von Neq014 (codonoptimiert).....	97
Abbildung 39: Elektrostatisches Oberflächenpotential von Neq014 und TehA	104

C Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Überblick über vorhergesagte Transportproteine von Archaeen	9
Tabelle 2: Übersicht der vorhergesagten Molekulargewichte (MW), die Anzahl der Transmembranhelices (TMH) und die Länge der Signalpeptide (SP) der heterolog exprimierten Membranproteine von <i>I. hospitalis</i>	61
Tabelle 3: 96-well Test zur GFP-basierten Optimierung der Expressionsbedingungen für Tko1655	68
Tabelle 4: 96-well Test zur GFP-basierten Optimierung der Expressionsbedingungen für Iho0391	74
Tabelle 5: Gelöste Kristallstrukturen sekundärer Transportproteine von Archaeen.....	123
Tabelle 6: Zugangsnummern für verschiedene Membranproteine.....	147
Tabelle 7: Zusammensetzung der 24-well Kristallisationsscreens für Neq014.....	151

D Zugangsnummern für Membranproteine

Tabelle 6: Zugangsnummern für verschiedene Membranproteine

Protein	Annotation/Vorhersage	Zugangsnummer
Membranproteine von <i>I. hospitalis</i>		
Iho0192	Kationentransporter	YP_001434783.1
Iho0298	MFS Transporter	YP_001434888.1
Iho0302	MFS Transporter	YP_001434892.1
Iho0391	MFS Transporter	YP_001434981.1
Iho0454	Na ⁺ /Solut Symporter	YP_001435044.1
Iho0555	MFS Transporter	YP_001435144.1
Iho0573	Aminosäure Permease	YP_001435162.1
Iho0800	MFS Transporter	YP_001435389.1
Iho1008	MFS Transporter	YP_001435594.1
Iho1012	MFS Transporter	YP_001435598.1
Iho1083	DedA Protein	YP_001435667.1
Iho1095	Auxin Efflux Carrier	YP_001435679.1
Iho1222	Chloridkanal	YP_001435805.1
Membranproteine von <i>N. equitans</i>		
Neq014	Anionenkanal	NP_963308.1
Membranproteine von <i>T. kodakarensis</i>		
Tko1655	MFS Transporter	YP_184068.1

E Sequenzalignments verschiedener Membranproteine von *I. hospitalis* und *N. equitans*

Für die folgenden Abbildungen wurden die Aminosäuresequenzen der jeweiligen Proteine mit dem Programm ESPript (Robert und Gouet, 2014) alignt.

Iho0192 – TrkH von *V. parahaemolyticus* (3PJZ; Cao *et al.*, 2011); Sequenzidentität: 25,4 %

	1	10	20	30	40	50
Iho0192MSLV.....VSSLAFFLASLT.....SLTYPYFDDYVALSFVIAAAYAYAAASRLVKYATAVTN					
TrkH	MQFRSIRIVGLLLALFSVTMLAPALVALLYRDGAGVPEVTTFFVLLFCG..AMCWFPNRRHKHELKSR.					
	60	70	80	90	100	110
Iho0192	PAIMIKALVLFWFLLTFVVALPFSYI..TGLIDSYFEMVSGFTGTGLTVLNPASAEF..VNALRASSQ					
TrkH	..DGFLIVVLFWTVLGSAGSLPFLIADNPNIISVTDABFESEFSAITTTGATVIIVGLDELKAILFYRQFLQ					
	130	140	150	160	170	180
Iho0192	WAGEVGFALFLLTILALIVFHVSPFTGIV...SALGKGERVRPSMYNLTIDLILIYLVLTITPITYMKLVGM					
TrkH	WEGGMGIIIVLAVAILPVLGIIGMQLYRAEIPGPVKDTKMTBRIAEAKALWYIYLSLTITACAVAFWLAGM					
	190	200	210	220	230	240
Iho0192	SLYDAIVVYTFAAATGGFAPTAGGTADLPF.VQQLAVILTCVLGAVNFSVYLN.L.RY..NKVRNALKHP					
TrkH	TFEDAISSHSTIAICGFSTHDASMGYFDSYAINLITVTVFLISACNFTLLHFAAFASGGVHPKYYWKDPE					
	260	270	280	290	300	310
Iho0192	LRLLIAS.IILFYALLLFLVWKRFD...AEHLWSALFHSASAVTTSGFQIQDVSKFGESSKYIITVAMI					
TrkH	FRATIFIQVILFLVCFLLLLKHHSYTSPTYDAFDQALFOTVSISSTTAGFTTTGFADWFLFLPVLVLLFSSFI					
	320	330	340	350	360	370
Iho0192	GASAFSTGGGVKLYRAYVLGKSIKMQIKSLGTGRGYVSTVTVMGKEITSEEITMLTVVATYLF..MFA					
TrkH	GGCAGSTGGGMKVIIRILLTLQGAELKRLVHPRVY.TTKVGGSAIPQRVDAVWGFSAVALVFVVC					
	390	400	410	420	430	440
Iho0192	LALVLTLEQLSAHKVKVPSIDVIFEVASAMSGTGLSSGLTATA...PPDVKITLSIAMILGKLEVLPLFL					
TrkH	LGLIAT.....GMDELSAFSAVAATLNNLGPGLGEVALHFGDVNDKAKWVLIIVSMLEGRLEIFTLI					
	460					
Iho0192	FLYDSLRSLKK.....					
TrkH	LLTPTTFWRSAAAENLYFQ					

Iho0454 – vSGLT von *V. parahaemolyticus* (3DH4; Abramson *et al.*, 2008); Sequenzidentität: 19,8 %

	1	10	20	30	40	50	60	70
Iho0454	MFSVVALIMVIIIVAITMGIAWWSYRRVRSVQDFYAAAGRSVPWILIAWALTSNYLSAASFGLVAGGISNF							
vSGLTAGRSVPWILIAWALTSNYLSAASFGLVAGGISNF							
	80	90	100	110	120	130		
Iho0454	GLDRVWDPFGYFAGWVLLVLAAY...IRKVGFETVADILTERFSGAPELRALAMIAATVIVISVFY..M							
vSGLT	GLAIAS..YEWMSA..ITLIIVGKYFLPIFIEKGYTTEFEVKEKRFNKKLKTII...LAVFWISLYIFVN							
	140	150	160	170	180	190	200	
Iho0454	IPQMI.GAGSLMSLLLDWPHYHVAVVVGAIIVLVVMLGGIRSTLYSQVFAQALVWFSMLLIFAAYMVAFG							
vSGLT	ITSVLVYLGGLALETILGIPLMYSILGLALFALVYSYGGLSAVVWTDVIOVFFLVLGGMTTYMAVSF							
	210	220	230	240	250	260	270	
Iho0454	GPSNLLLESSWKVPPPALAKKYFEPKEIDVNQITFRTALQESLKAAEEVLQKNPELPRLPQPGAFARDVWN							
vSGLT	GTDG.....WVAGVSKM.....VDAAPGHFEM.....ILDQSNPQYMLNPGIATVLIIGGLWV							
	280	290	300	310	320	330		
Iho0454	QFSLALGIIMGTVGLPHVLLVYFYTVPKPSDARKGTVGATFNIGLFYLFYSIFVGFAGGTALFYVITN....							
vSGLT	ANLYYWGFNQYI.....IQRTLAAKSVSEAOKGVFAAEKLL...IVPFLVVLPGIAAYVITSDPQLM							
	340	350	360	370	380	390		
Iho0454WLTGYVPWAKNM.PVVMSCGLLGGELLMGLAAAGAFAAILSTVGGLMVAATNSVA							
vSGLT	ASLGDIAATNLPISAANADKAYPWLTOFLPVGVKGVVF.....AALAAIVSSSLASMLNSTATIFT							
	400	410	420	430	440	450	460	
Iho0454	YDEYANIVRKKGASEEEQLFVARLVALGVGAVAVGGIILKGFVDVSYLVLV.LAFGIAASSFATILIMNLW							
vSGLT	MDYKEYISPDSGDH.KLVNVRGTAADVVALIIACLIAPMLGGIGQAQYIQEYTGVLSPGILAVFLIIGLF							
	470	480	490	500	510	520	530	
Iho0454	WDKFTRSQAVASMLVGLTSLVLFVLRLLSGKALGPVPLVQFALYSVPASFIAQIVVSKLTS...DTGS							
vSGLT	WKKTTSKGAIGVVASIPFALLFLKFMPLSM.....BF.MDQMLYTLTFMTVY.IAFTSLSTISINDDP							

Iho0573 – ApcT von *M. jannaschii* (3GIA; Shaffer *et al.*, 2009); Sequenzidentität: 43,8 %

	1	10	20	30	40	50	60
Iho0573	...MRELGLEAVALGVGITIGASIFSIA	GVGVKLAGPNLPEAFALS	AYAFLLIAYSYAKLSRKFTSNA				
ApcT	MELKNKKLSLWLVASMAVGVMIGASIFSIF	GVGAKIAGRNLPETFILSGIYALLVAYSYTKLGAKIVSNA					
	70	80	90	100	110	120	130
Iho0573	GPVEYVVRVAFGDNLLVGTALIIYWLNFVFSISLF	TYTIIAGYALGALGLADDAFLFSISQALITISIFVALN					
ApcT	GPIAFIHKAIKDNIITGALSILLWMSYVTSIALF	AKGFAGYFLPLINAPINTFNIAITEIGIVAFETALN					
	140	150	160	170	180	190	200
Iho0573	FKGSKAVADTELIIVIFKLAVLLTIIIVGLRVINPEL	LKPDASPOGILNALTASSLFLLSYAGFGVITNA					
ApcT	FFGSKAVGRAEFFIVLVKLLILGLFIFAGLITTHPSY	VIPDLAPSASVSGMIFASAIFFLSYMGFGVITNA					
	210	220	230	240	250	260	270
Iho0573	SENIRDPKKNVPRAIYLSLALSAVVYVGVSTIVT	VGTTERAKVLEAEYALAVVAKSAIGSWGPAALLTIGA					
ApcT	SEHIENPKKNVPRAIFISILIVMFVYVGVATISAT	IGNLPIDELIKASENALAVAAPFIGNIGFLLISIGA					
	280	290	300	310	320	330	340
Iho0573	IVSASTALNSALYGGANVAYSLAKK	GELPESEDRRVWFGEPEGLYVTAALALAFSLSLN	LEGVAEVTTIS				
ApcT	LFSSISAMNATLYGGANVAYSLAKD	GELPEFERKRVWFKSTEGLYITSSALGVLFALLFN	MEGVAISITSAV				
	350	360	370	380	390	400	410
Iho0573	LILTYISVVLSHWKLRVV	VGGNAAVVLTALVVLVFNAIIILSHEFLTNP	LAFQASVGTAVGALIFEAFYR				
ApcT	FMIYILFVILSHYIIDE	VGGRKEIVFISFTIVVLGVFLLLLYYQWITN	RFFVYGIITATIGVLIFFIIR				
	420	430	440				
Iho0573	SWRKRRAIKARTLQGA...EGLKRQPVETS						
ApcT	KVTIKRTFSNNMYVKSLESSGLVPR.....						

Iho0800 – Tko1655 von *T. kodakarensis*; Sequenzidentität: 35,0 %

	1	10	20	30	40
Iho0800MLEYLFGLVSM	LADFVYEGGRSAIPAEIRDPVE.....	LGITSGTSEGLGYLL		
Tko1655	MNGEKGKTNERKIFGISWNV	FLGLVFSFLNDMSSSEMISPIVPSYLTDL	VLGEGKLISGSTMGAIESMSSLF		
	50	60	70	80	90
Iho0800	RALSGLVMDKLGALHYL	FMFLGYSLVVAYP.TAALIPSLTTLFLVAV	VVERIGKAIKSPARDALVAANVE..		
Tko1655	KVAFGLVYSDRFRKKR	AFVFIGYALSTLAKGALAFTRSWWD	FLTLRALDRIGKIRIAPRDALIAESSEK		
	120	130	140	150	160
Iho0800	DEPKAFFAIIEVMDQAGAVAGPLIT	LFLSSYF.GLRES...MVVF...FIPYTIMIL...	ILKLRNLKV		
Tko1655	KSGLKSGFGRHMMDTLGAVAGPLV	AIGILKLEGLPVEKAYRYVFLLSA	VPGLISLLVILLVKDRGA		
	180	190	200	210	220
Iho0800	PRKKEVWVSAGSAVAFSFLIGASFVQ	P...ILSVASAPQPV	LGVALVM.....LV	DALASVLMGK	
Tko1655	KKITGILSTLRDRNLQLFLAVVAL	GALGRYSYAFTLWKAEELGYT	VVQGMAYALFNTIYAL	SAYPIGI	
	240	250	260	270	
Iho0800	FFRKLIVYLAPLLALSSLSLKD	WRFLPLA.....	GVAIAYTEVVRAVIAEAG...		
Tko1655	YSDRLG.....KKRMITAGFAV	ALASLAFAYARDLATLVGAFALY	GLYIAIEDTVPRAVMA	DLAKDY	
	280	290	300	310	320
Iho0800	GEGRILYGLAYALGLGYFVGG	LVMPSLSEAEALAVYSLS	LSG...A...ALAFIPKR	GERLIPKL	
Tko1655	EKGTLIGAYHTVFGIFVL	PASVIAGYLWKTYSLTYS	FLFSAMNLLALVLM	LVPER.....	

Iho1083 – DedA von *E. coli* (AAA23964.1); Sequenzidentität: 17,8 %

	1	10	20	30	40	50	60
Iho1083	MPPPAFPFGKRS	LGDP	IEDLT	TKTLLSLTER	YGLFGV...	FLISEVGNATPY	ATVPYLA.....LI.AALAA
DedA	MDL.....IYFLIDF	ILHLIDVHLAE	LVAEYGVNV	VYAILFLILECE	TGL..VVTPE	LPDGSLLFV	VAGALAS
	70	80	90	100	110		
Iho1083	QK...SLTLPEAVLWS	VVGG	LGAAALGKVVVYLT	GVGTSEELP.....	EKVRKNFELFSKIAQ	RGIF	
DedA	LETNDLNVHMMV...	VLMLIAAIVG	AVNYITIGRLFG	EKLFSNPNSKIFRRSY	LDKTHQFYEKHGG	KTI	
	120	130	140	150	160	170	180
Iho1083	VAVFLFAALPLPDDV	L..YVPLG	AVRYPLIKFFFAVW	LCKI...IITFL	SIAFGNAYSRI	MEEYNVN	AT
DedA	LARFV....PIV	RTFAFPVAGMG	HMSYRH..FAAYNV	IGALLWVL	LFITYAGYFFGT	IP...M.....VQ	
	190	200	210	220	230	240	250
Iho1083	ESAIIILIV	ATVVL	MVIIGRMD	WARIAIAL	SQRTLYALYVMS	DELA	KAIGLKWLARKISSLLSKPEGAGH
DedA	DNLKLLIV	GIIIVS	ILPGVIEI	IRHKRAA	AAAAA		

Iho1095 – AEC von *T. albus* (YP_003473294.1) und *A. nitrofigilis* (YP_003656509.1)Sequenzidentität: 27,1 % (*T. albus*); 25,6 % (*A. nitrofigilis*)

```

1      10      20      30      40      50
Iho1095 MSALDAVSLALLLGFPPLGRT.RAKALAPP LSKFLVYAVAPV LGFWAGTHLESEP.LLPL
AEC[T.albus] MP...DIFLP LLACYILRRVVFKEEDARV LINYVLYFALPITSFMAAHR LGINREV ISI
AEC[A.nitrofigilis] MLDPLVLPIALYLMICYFFKI..FIKDNSQALVD FVIYFSIPAMVFIKIYPIALDFKFLNM

60      70      80      90      100
Iho1095 .....ALVAE VITFY LAR KAFEG.CEKKGAAG IVSAFGNTIFIGIPAVLAAG GSV..SA
AEC[T.albus] VLLAWSS IIFCILLAWLVGKLFSGPTLRSLF LVSSFGNTAFILGYPTVTLLGKEALPY
AEC[A.nitrofigilis] IFMNTI ILLANLVLYF IGRKFLKFEKKTATFM AVGTFGNTSEVGFSGSYIDAFY QDYVVY

110     120     130     140     150
Iho1095 AAAYAMLTTFVHYT.LAALYSCKGRGKLFKLQPF.....TITFL LGV L GPFSSQQL
AEC[T.albus] AVIYDNLG SFLLVSSV GITVAT.G.....RPDIRRVITFPF LALLIGFITRPIEIPP
AEC[A.nitrofigilis] ALIYDLFG SFLLVSSV LGSIIVNWGSGELIKFKAMTRKVLFFPPIIMFFVTIILKFFTVP

160     170     180     190     200     210
Iho1095 EGLRWTEALAAELSKLGLLILGLSFEFQYLRVDWEVLKVGAF.KHL L L PALTL PV....
AEC[T.albus] YLYHAMELVSSSLPAVILFSGMGLLLNLSHLKRGGWKVLGALLIKMGVSPLLTAWI.LQHT
AEC[A.nitrofigilis] FVMNTAS AIGATVVPVAMIAIGMKLEVKNIFYKFKT V SLL L GIKMFLMPILVMIGFSIFY

220     230     240     250     260     270
Iho1095 .ALLTEPKSIMELEASMPPEFMNIALAYAYGYDTKLVTKS VITLTLAWLPAPL LSLAPLLRA
AEC[T.albus] TLPDPAYKTIVLLQSSMPPMLMAGVLSVRYGLDVS LAFTSIGAGM... LISFLTVP LIGRI
AEC[A.nitrofigilis] NLDDTWS KATILEVA MPPMTMAVILAIQGG LDERLAVNALV VIGV... LLSL LSV TGFYYF

```

Iho1222 – EriC von *E. coli* (1KPK; Dutzler *et al.*, 2002); Sequenzidentität: 18,3 %

```

1      10      20      30      40
Iho1222 .....MKV.....NDLPEDLQAL...GAFLIGLVSCRAVAFFTDVFVWSNKF RYV....
EriC MKTDPSPLETPQAAR LRRQLIRQLERDKTPLAILFMAAVVGT LVGLAAVAFDKGV AWLQNRMGALVH

50     60     70     80     90     100     110
Iho1222 LATNYPHLFA LVSVSI..LFTA YFLKLLG.TLHGSSTSYVRSYHAKLGYIGKKE L VYTLG SIT SAL
EriC TADNYPL LTLVAF LCSAVL AMFG YFLVRKYAPEAGSGSGIPEIEGALEDQR PVRWVRVLPVKFFGLGLTLG

120     130     140     150     160     170
Iho1222 GGAVVCP EGP GIALG AFGYWLAWWLGAARGEELK.RMVLV GAAAGVASVFRAPL TAMAFAMEVPYKRA..
EriC GGMVLCREGPTVQIGGNIGRMVLDIFRLKGDEARHTLLAT GAAAGLAAAFENAPLAG I LFIIEEMRPQFRY

180     190     200     210     220     230     240
Iho1222 ...IEGGIFLQALVATLTSYLVTVFLAGPQRLLLVS RPFKPPYP SLDVV LASLG VGGTAALTYI IYFIK
EriC TLISIKAVFLGVIMSTIM.....YRIFNHEVA....LIDVGLKSDAPLNTLWLVLIL

250     260     270     280     290
Iho1222 ....HKS GELSDKFVR.....RRYWFVPPLALSLIISTFIVSP LVP GADL L TEKVFNEP
EriC GIIFGIF GP I FNKVV LGMQDLLHRVHGGNITK WLMGGAIGGLCGLLG.FVAPA TS GG GFNLIP..IATA

300     310     320     330     340     350     360
Iho1222 ESLEEETLALVAVAKS LLLP LSLTWGATGGLFMPLVSIGSALGLLYAK...FFSIHT..VEPI MIAGVS
EriC GNFSMGMLVFI FVARVITTL LCFSS GAPGGIFAPMLALGTVLGTAF GMVAVELFPQYHLEAGTF AIAGMG

370     380     390     400     410     420
Iho1222 SLFASSMKTL L TS VLI GVEFLGFGAFFTSTVAASVGYLTL L PVSIV.....AGQLPEP QDIKKRS
EriC ALLAASIRAP L TG IILV LEMTD.....NYQLILPMTITGLGATLLAQFT GGKPLYSAI LART

430     440     450     460     470     480     490
Iho1222 IIEIYLKLEKKGF EKALRVEVENIVNKNVLRF TENMTVAEALDLAAKETHNHYPVVDANDKLVGEVSLE
EriC LA.....KQE.....AEQLARSKAASSENT.....

```


Neq014 – TehA von *H. influenza* (3M71; Chen *et al.*, 2010) und **SLAC1** von *A. thaliana* (Q9LD83);

Sequenzidentität: 23,5 % (TehA); 23,1 % (SLAC1)

	10	20	30	40	50	60	
TehA	...HFAHIFQNKV...HTMNITKFFPLPT	GYFGIPGLAALS	LAWFH	LENLFPAARMVSDVLG	IVAS	AVWIL
Neq014MTCRIRYFQPG	FFAIPVCI	GGLSIAYLR	LAEFL	...PYLKS	...IGLG	LAWL
SLAC1	RGPELDEVKDNEIDILLPKEEQWPFLLRFPI	GCGFICLGLSSQAV	LWLA	LAKSPATNFLHITP	...INL	VVWL	FSLVVLVS
	70	80	90	100	110	120	130
TehA	FILM	YAYKLR	YFEEVRA	EYHS	EVRF	SFI	ALIPITTMLVGD
Neq014	IAIL	YLA	KIV	FFKQEF	LK	DINN	PIKLSML
SLAC1	VSFT	YIL	KCI	EYFEAVKR	EYFH	BRV	NFFAPWVVCMLAISVPP
	140	150	160	170	180	190	200
TehA	TLRVSEL	WQGGVFE	..QKSTH	SFYLP	AVAA	NFTSASSLALLGYHDLGYLF	F
Neq014	TYFNLRT	WITKDLH	..LSTIT	PTWYIP	IVG	NILVPTIPINQILGIFNWFF	S
SLAC1	ELKIYG	WLSGGKRRRLCKVAN	PS	SHLS	VVG	NFVGAILASKVGVDEVAKFL	W
	220	230	240	250	260	270	280
TehA	RATMG	IVTAPAF	VCVSA	YLS	INHGEV	DTLAKIL	WGYGFLQLFF
Neq014	LPSLF	ITLAPPS	VGFIS	YIKIT	.HSLDSIANIL	YFTALAFLL	LV
SLAC1	HPVYS	MTAPSA	ASIAWNT	IV	.GQFDGCSRTC	F	FIALFLYIS
	300	310	320				
TehA	NVLQGV	SIF	AFVFS	..NVM	IGL	LVLMTIYK
Neq014	TKMPLF	IDLAIAIESLA	TILLTIVGIKT	LIAIK	KGICKEE
SLAC1	VPGYPSRAL	ALTLSFIS	TAMVC	LVFVSTLLHAFVWQTLFPNDL	ATAIT	KRKL	TREKKPFKRAYDLKRWTKQALAKKISAE

F Zusammensetzung der 24-well Kristallisationsscreens für Neq014

Für Kristallisationen von Neq014 im 24-well Format wurden jeweils drei verschiedene Ansätze angefertigt. Die genaue Zusammensetzung dieser drei Screens ist im Folgenden aufgelistet.

Tabelle 7: Zusammensetzung der 24-well Kristallisationsscreens für Neq014

	Salz	Puffer	pH	Fällungsmittel
Screen 1	50 mM NaCl	100 mM	4,0–6,5	PEG 400: 20–26 % (v/v)
		Natriumcitrat	[in 0,5 Schritten]	[in 2 % Schritten]
Screen 2	50 mM NaCl 20 mM	100 mM	4,0–6,5	PEG 400 20–26 % (v/v)
	MgCl ₂	Natriumcitrat	[in 0,5 Schritten]	[in 2 % Schritten]
Screen 3	50 mM NaCl	100 mM	5,5–8,0	PEG 400: 22 % (v/v)
	MgCl ₂ (0/20/40/100 mM)	Natriumcitrat	[in 0,5 Schritten]	

G Publikationen

Huber, H., Küper, U., **Daxer, S.**, & Rachel, R. (2012). The unusual cell biology of the hyperthermophilic Crenarchaeon *Ignicoccus hospitalis*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 102 (2), 203–219.

Mayer, F., Küper, U., Meyer, C., **Daxer, S.**, Müller, V., Rachel, R., & Huber, H. (2012). AMP-forming acetyl coenzyme A synthetase in the outermost membrane of the hyperthermophilic crenarchaeon *Ignicoccus hospitalis*. *Journal of bacteriology*, 194 (6), 1572-1581.

H Danksagung

Zum Schluss möchte ich mich herzlich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Mein besonderer Dank gilt dabei:

Prof. Dr. Christine Ziegler für ihre engagierte Betreuung, die zahlreichen konstruktiven Gespräche (nicht nur über wissenschaftliche Themen), dafür, dass sie mich mit ihrer mitreißenden Art immer wieder motiviert hat und nicht zuletzt für die Möglichkeit, einen unvergesslichen Forschungsaufenthalt in Los Angeles erleben zu können.

Dr. Harald Huber dafür, dass er mir während der letzten Jahre immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat, seine Türe wirklich jederzeit für mich offen stand, für seine immerwährende Diskussionsbereitschaft und die unzähligen nützlichen Anregungen, die meine Arbeit vorangetrieben haben.

Prof. Dr. Reinhard Wirth nicht nur für die vielen hilfreichen Ratschläge und Diskussionen in den IgNi/Nano-Seminaren, sondern auch für die Begutachtung dieser Arbeit.

Prof. Dr. Reinhard Rachel für die konstruktiven wissenschaftlichen Diskussionen und das Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

Prof. Dr. Michael Thomm für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit an seinem Lehrstuhl durchzuführen und die bereitwillige Bereitstellung eines Zellkulturlabors.

Prof. Dr. Ronald Kaback und **Dr. Gregor Madej** für eine unvergessliche Zeit in Los Angeles, die anregenden Diskussionen über MFS Proteine und viele lustige Abende auch außerhalb des Labors.

Elisabeth Nagelfeld und **Claudia Pauer** für die Hilfe bei allerlei organisatorischen Problemen.

Dem gesamten Huber-Team: **Gabi Leichtl**, **Veronika Menath** und **Lydia Kreuter** für die zahlreichen lustigen Stunden aber auch für allerlei Tipps und Tricks im Laboralltag, dafür dass sie immer ein offenes Ohr für mich hatten und das familiäre Arbeitsklima. Außerdem möchte ich meiner ehemaligen Studentin **Kristina Plobner** für den Beitrag zu dieser Arbeit danken.

Dem gesamten Ziegler-Team: **Barbara Kellerer**, **Dr. Rebecca Michaela Gärtner**, **Dr. Balasubramaniam „Balu“ Dhandayuthapani**, **Claudia Georgi** und **Sabine Ruppel** für die Unterstützung im und außerhalb des Labors, das ausgezeichnete Teamwork, die vielen wertvolle Tipps und dafür, dass mit ihnen auch der Spaß bei der Arbeit nicht verloren geht; **Dr. Silvia de Sanctis** und **Nisha Sharma** für die zahlreichen bioinformatischen Analysen; **Veronika Heinz** für die Aufnahme der EM-Bilder und dem ehemaligen Studenten **Vali Rauca** für die unermüdliche Hilfe bei den Neq014 Expressionen.

Dr. Eva Schweikhard und **Dr. Kristian Parey** für die gute Zusammenarbeit und den wissenschaftlichen Austausch dank dem es mir gelungen ist, auch auf vollkommen fremden Gebiet Fuß zu fassen.

Dem gesamten **Lehrstuhl Mikrobiologie** für das angenehme Arbeitsklima, das hervorragende Teamwork und die vielen unvergesslichen Momente während diverser Feiern und Ausflüge. Ein besonderer Dank gilt außerdem **Dr. Winfried Hausner** und **Renate Richau** für die Hilfe bei den *Pyrococcus* Expressionen.

Pia Wiegmann dafür, dass sie mich auch in angespannter und gestresster Laune ertragen hat, immer für mich da war und ist, fürs Zuhören und das mit mir Lachen und mit mir Weinen (meistens vor Lachen). Natürlich danke ich ihr auch für die unfassbar gute Zusammenarbeit und dafür, jemanden gefunden zu haben, mit dem ich mich auch ganz ohne Worte verstehe! :-* :-* :-*

Meiner **Familie** möchte ich von ganzem Herzen für die kompromisslose Unterstützung, ihre Liebe und den Glauben an mich danken.

Nicht zuletzt gilt ein liebevoller Dank **Peter Stelzer** dafür, dass er mir bei allen Herausforderungen des Lebens zur Seite steht, für seine unglaubliche Geduld und den Rückhalt den er mir gibt.

I Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere, dass ich diese Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Regensburg, Januar 2016

.....